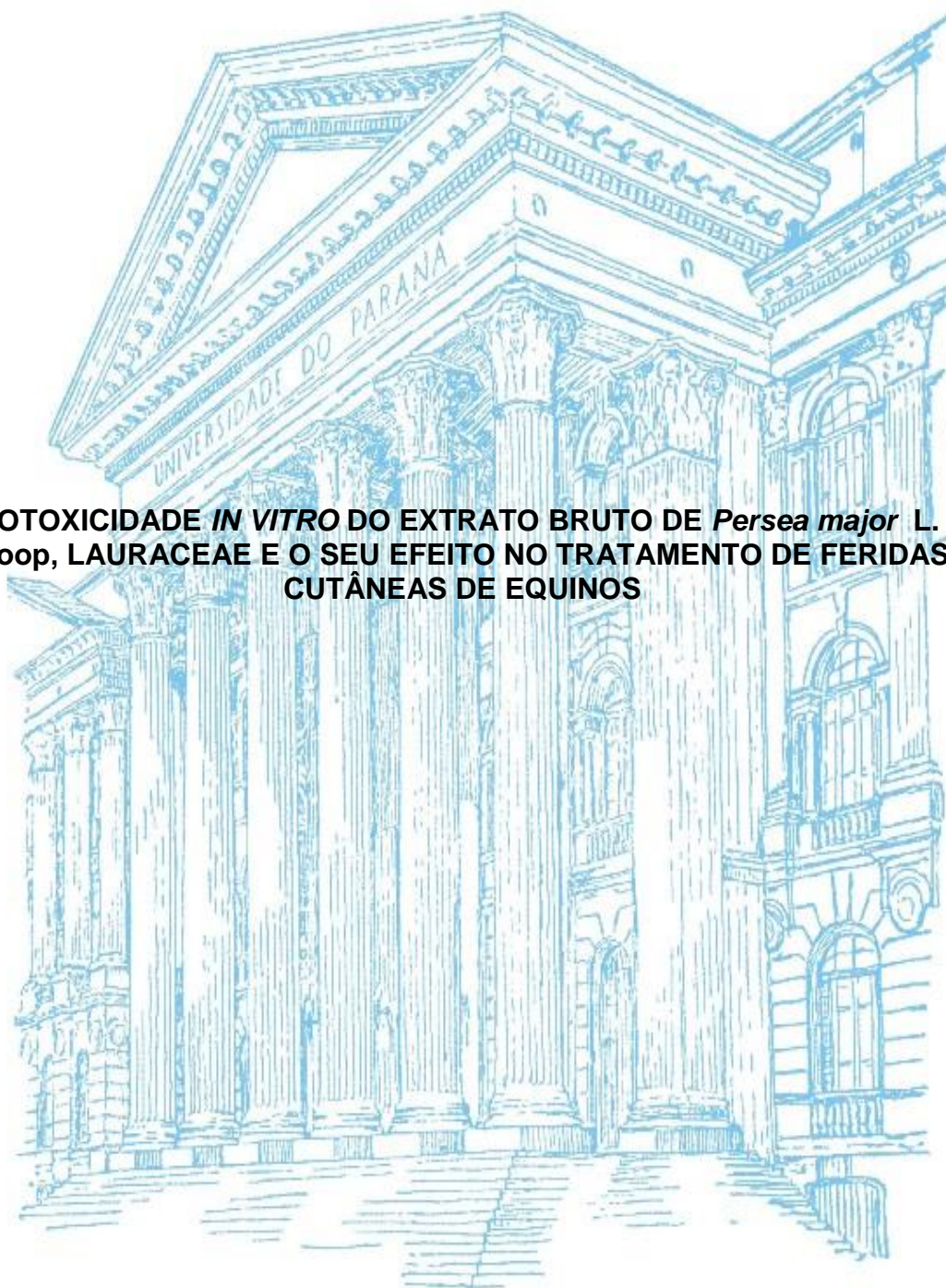


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIO WALDIR CUNHA DA SILVA

**CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO BRUTO DE *Persea major* L. E.
Koop, LAURACEAE E O SEU EFEITO NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS DE EQUINOS**



CURITIBA
2013

ANTONIO WALDIR CUNHA DA SILVA

**CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO BRUTO DE *Persea major* L. E.
Koop, LAURACEAE E O SEU EFEITO NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS DE EQUINOS**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área Insumos, medicamentos e correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra Tomoe Nakashima

**CURITIBA
2013**

Silva, Antônio Waldir Cunha da
Citotoxicidade *in vitro* do extrato bruto de *Persea major* L. E. koop,
Lauraceae e o seu efeito no tratamento de feridas cutâneas de equinos
/ Antônio Waldir Cunha da Silva – Curitiba, 2013.
77 f. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Citotóxico. 2. Extrato bruto. 3. Equinos. 4. *Persea major*.
I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.


CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

ANTÔNIO WALDIR CUNHA DA SILVA

Título: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE PAU-ANDRADE – *PERSEA MAJOR* KOOP, LAURACEAE

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof.^a. Dr.^a. Tomoe Nakashima
Orientadora


Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos
Universidade Federal Rural da Amazonia


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dr. Sandro Germano
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Ivan Deconto
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 15 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

*Dedico a Deus por conceder a realização desta tese.
Aos meus pais, Raimundo e Conceição Silva.
Aos meus filhos, Rafael e Natália Silva.
À minha esposa, Renata, pelo apoio incondicional durante todas as fases desta tese.
Aos meus sogros, Renato e Viviane Fiore.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de desenvolvimento da presente tese.

À minha orientadora, Tomoe Nakashima, pela oportunidade de crescimento profissional, ensinamentos, confiança, amizade, paciência, apoio e conselhos, sendo um exemplo de competência e perseverança.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por suas colaborações, que tornaram possível a realização desta tese.

À pesquisadora e diretora Rosária Regina Tesoni de Barros Richartz, do Laboratório Estadual Marcus Enrieti, pela contribuição nos ensaios de citotoxicidade.

Ao pesquisador Ernesto Renato Krüger, do Laboratório Estadual Marcus Enrieti, pelas contribuições.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, a Sayonara Mendes Silva e a Simone Yae Abe (IC/PIBIC), pelo convívio, amizade e apoio, quando necessário.

Ao professor João Carlos Possamai, pelas orientações nas análises estatísticas.

À Engenheira Agrônoma Maria Emília Kudla, pelo auxílio nas análises das imagens.

Aos amigos, pelo apoio em todos os momentos.

Aos professores e técnicos do Departamento de Medicina Veterinária do SCA, pelo apoio.

E a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo.

“Só posso compreender um todo se conheço, especificamente, as partes, mas só posso compreender as partes se conhecer o todo” (PASCAL).

RESUMO

No Brasil, vários grupos de pesquisa têm contribuído significativamente para o desenvolvimento em química de produtos naturais, quimiotaxonomia farmacologia, além de envolvimento de outras áreas relacionadas. O objetivo do presente trabalho foi demonstrar os efeitos do uso tópico de extrato bruto de *Persea major* no tratamento e sobre a velocidade de contração cicatricial de feridas cutâneas em equinos. A metodologia de obtenção dos extratos foi a maceração das cascas fragmentadas em etanol a 70%(v/v em água destilada), durante dez dias a temperatura ambiente. Decorrido este período foi filtrado foi submetido a nova extração a temperatura moderada (60°C), com etanol a 70%, até esgotamento total dos bioativos. Com os extratos foram realizados os testes de citotoxicidade, avaliação da contração cicatricial, biopsias cutâneas para avaliação histopatológicas e clínicas dos animais. Os resultados obtidos nos exames clínicos estão representados nos apêndices. Os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos valores de normalidade para a espécie. As análises de citotoxicidade aguda *in vitro* do extrato bruto de *P. major* não demonstraram alterações citotóxicas. As aplicações do extrato sobre as feridas de equinos foram eficazes na promoção da cicatrização, permitindo a reparação das lesões. Diante dos dados obtidos pode-se concluir que o extrato bruto de *P. major* não apresenta citotoxicidade, apresenta atividade cicatricial e pode sugerir a elaboração de uma forma farmacêutica contendo extrato de *P major* com atividade cicatrizante para uso em equinos.

Palavras-chave: *Persea major*, extrato bruto, feridas, equinos

ABSTRACT

In Brazil, several research groups have been contributed significantly to the development in natural product chemistry, pharmacology chemotaxonomy, and other related areas. The aim of this study was to demonstrate the effects of topical crude extract of *Persea major* treatment of skin wounds in horses and on the speed of contraction scar. The extracts were obtained by maceration of fragmented CASCAS in 70% ethanol (v / v in distilled water) for ten days at room temperature following filtration and a second extraction with 70% ethanol at 60°C until total depletion of the bioactive. With the obtained extracts, cytotoxicity tests, assessment of scar contraction, skin biopsies for histopathological analysis and clinical evaluation of the animals were performed. The results obtained in clinical trials are represented in the appendices. The parameters evaluated were within the normal range for the species. Analyses of acute *in vitro* cytotoxicity of *P. major* crude extract showed no cytotoxic changes. The applications of the extract on equine wounds were effective in promoting the healing, allowing the repair of lesions. These data allow us to conclude that the crude extract of *P. major* is not cytotoxic and it may play a role in wound healing. Yet, it suggest that the development of a pharmaceutical formulation containing *P major* extract with healing activity to be used in horses may be effective.

Keywords: *Persea major*, brute extract, wounds, horses.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFIA 1 – EXEMPLAR DA ÁRVORE DE <i>Persea major</i>	28
FOTOGRAFIA 2 – ASPECTO DO TRONCO E DA CASCA DE <i>Persea major</i>	40
FOTOGRAFIA 3 – REPRESENTAÇÃO DA DELIMITAÇÃO DA FERIDA EM FOLHA DE PAPEL VEGETAL.....	47
FOTOGRAFIA 4 – APLICAÇÃO DO EXTRATO NA FERIDA (A SETA INDICA O SENTIDO DA APLICAÇÃO).....	48
FOTOGRAFIA 5 – EVOLUÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL DA FERIDA DO ANIMAL 1 EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE COÁGULOS (C) E FIBRINA (F).....	54
FOTOGRAFIA 6 – A RECONSTRUÇÃO EPITELIAL E DE SEUS ANEXOS (PÊLOS)	54
FOTOGRAFIA 7 – ILUSTRA O FECHAMENTO DA FERIDA APÓS 25 SEMANAS DE TRATAMENTO	55
FOTOGRAFIA 8 – ASPECTO GERAL DA FERIDA DO ANIMAL 2 COM DESTAQUE A PRESENÇA DE COÁGULO(C) E DE FIBRINA(F).....	56
FOTOGRAFIA 9 – RECOMPOSIÇÃO DA PELE E ANEXOS CUTÂNEOS (PÊLOS). ANIMAL 2 COM 15 SEMANAS DE TRATAMENTO	56
FOTOGRAFIA 10 –ASPECTO MACROSCÓPICO DA EPITELIZAÇÃO DA FERIDA DO ANIMAL 2 COM 20 SEMANAS DE TRATAMENTO.....	57
FOTOGRAFIA 11 – ASPECTO MACROSCÓPICO DA EPITELIZAÇÃO DA FERIDA DO ANIMAL 2 COM 20 SEMANAS DE TRATAMENTO.....	56
FOTOGRAFIA 12 – ASPECTO MICROSCÓPIO DA BIOPSIA DA FERIDA CUTÂNEA TRATADA POR UMA SEMANA COM EXTRATO BRUTO DE <i>P. major</i> EM EQUINOS. COLÁGENO ORIGINAL (CI); FOLÍCULOS PILOSOS(Fp). HE-400x.	59
FOTOGRAFIA 13 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR CINCO SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE <i>Persea major</i> EM EQUINOS. DESTACA-SE A NECROSE (N); INFILTRADO INFLAMATÓRIO (CInf) E NEOVASCULARIZAÇÃO (Nvc) HE 400x.....	59

- FOTOGRAFIA 14 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR DEZ SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE O COLAGENO FROUXO (**CIFx**); NEOVASCULARIZAÇÃO (**Nvc**) E AS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (**PMN**).
MASSON 400x 60
- FOTOGRAFIA 15 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR QUINZE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE AS FIBRAS COLÁGENAS FROUXAS (CIFx); NEOVASCULARIZAÇÃO (**Nvc**).
HE 400x..... 60
- FOTOGRAFIA 16 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR VINTE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* DE EQUINO. DESTACA-SE O EPITÉLIO RECONSTITUÍDO E SEUS ANEXOS – GLÂNDULAS SEBÁCEAS (**GSb**); GLÂNDULAS SUDORÍPARAS (**GSd**) E FOLÍCULOS PILOSOS (**Fp**). HE 400x..... 61
- FOTOGRAFIA 17 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS POR VINTE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINO. DESTACA-SE O EPITÉLIO RECONSTITUÍDO; E SEUS ANEXOS – GLÂNDULAS SEBÁCEAS (**GSb**); GLÂNDULAS SUDORÍPARAS (**GSd**) E FOLÍCULOS PILOSOS (**Fp**). HE 400x..... 61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO, TANINO CONDENSADO - PROANTOCIANIDINA	30
FIGURA 2 – FASE INFLAMATÓRIA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	33
FIGURA 3 – FASE PROLIFERATIVA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	34
FIGURA 4 – FASE DE ANGIOGÊNESE DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ..	36
FIGURA 5 – FASE DE REMODELAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ..	37
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DE PREPARO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Persea major</i>	42
FIGURA 7 – ESQUEMA DA OBTENÇÃO DAS BIOPSIAS DE PELE	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – COMPARATIVO DO TEMPO MÉDIO DE CONTRAÇÃO CICATRICIAL DAS FERIDAS TRATADAS EXPERIMENTALMENTE COM EXTRATO BRUTO DE <i>Persea</i> <i>major</i>	52
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DADOS MACROSCÓPICOS ENCONTRADOS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS DOS ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO BRUTO DE <i>Persea major</i> NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20	58
QUADRO 2 – DADOS HISTOPATOLÓGICOS DIAGNOSTICADOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO DE <i>Persea major</i> NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO TOTAL, TAMANHO E VIDA MÉDIA DAS HEMÁCIAS DOS DIFERENTES ANIMAIS	51
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS ÁREAS DAS FERIDAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO DE <i>Persea major</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	– Síndrome da deficiência imunológica adquirida
DMSO	– Dimetilsulfóxido
EB	– Extrato bruto
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
FBS	– Soro fetal bovino
HE	– Hematoxilina e eosina
HOVET	– Hospital veterinário
MC-LR	– Microcistina-LR
MEM	– Meio mínimo essencial
NR	– Vermelho neutro
PA	– Pau andrade
PBS	– Tampão fosfato salino.
PMN	– Polimorfonuclear
UFPR	– Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 HISTÓRICO DE FITOTERÁPICOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	23
2.1.1 Fitoterápicos e a Cicatrização de Feridas em Equinos	26
2.2 <i>Persea major</i> L. E. Kopp – PAU-ANDRADE	27
2.2.1 Taninos	29
2.3 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	31
2.3.1 Fases do Processo de Cicatrização	32
2.3.2 Cicatrização de Feridas em Equinos	37
2.4 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	40
4.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE	43
4.3 EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS VERO-E6 AO EXTRATO BRUTO DE <i>P. major</i>	44
4.4 TESTE DO VERMELHO NEUTRO	44
4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL	45
4.6 CÁLCULO DA ÁREA DA FERIDA UTILIZANDO WinRHIZO	48
4.7 BIÓPSIAS CUTÂNEAS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	48
4.8 DADOS EXPERIMENTAIS	49
4.9 ANÁLISE DOS DADOS	50
5 RESULTADOS	51
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	50
5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICAS DAS FERIDAS	51
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS FERIDAS	58
5.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	63
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma grande biodiversidade de cerca de 55.000 espécies de plantas superiores. Pesquisas realizadas nas Universidades e Institutos de Pesquisas nacionais revelam a presença de substâncias ativas vegetais, indicadas para o tratamento de inúmeras doenças, tais como: câncer e AIDS, além daquelas com efeitos analgésicos, antiparasitários, antibióticos e outras atividades biológicas. Apesar de o Brasil ser considerado o país com o maior número de espécies botânicas no mundo, estudos sobre possíveis efeitos terapêuticos dessas ainda são muito reduzidos e poucas informações são conhecidas sobre a composição química das plantas do país. Diante dessa realidade, pode-se afirmar que as plantas medicinais brasileiras são um patrimônio cultural incalculável (DI STASI, 1996).

No Brasil, vários grupos de pesquisa têm contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais, quimiotaxonomia, da farmacologia de produtos naturais, além de outras áreas relacionadas. Por outro lado, não temos uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos ficando, inclusive, em segundo plano em relação a países menos desenvolvidos tecnologicamente.

Com relação à fitofármacos, Yunes *et al.* (2001A e B) consideram que o estado de arte da maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira, infelizmente, está fundamentado somente no uso popular das plantas, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica, sem condições, portanto, de competir a nível nacional e, muito menos, internacional, o que pode acarretar no desaparecimento das indústrias nacionais de fitoterápicos.

Dentre os representantes da biodiversidade brasileira, com potencial de bioatividades, inclui-se *Persea major* (pau-andrade) pertencente à família Lauraceae, de ocorrência espontânea e de distribuição ampla no estado do Paraná (KOEHLER *et al.*, 2002). Entretanto, têm seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico do emprego dessa planta, sendo utilizado no tratamento de feridas cutâneas e em distúrbios gástricos.

Na rotina diária, os médicos veterinários atendem pacientes com os mais diversos tipos de ferimentos, devendo escolher a melhor forma de tratamento, em busca da reparação tissular e, cuja instituição, depende da localização do ferimento,

grau de lesão tecidual, tipo de secreção e de cicatrização observada (PEREIRA; ARIAS, 2002).

A capacidade de reparação tecidual observada nos seres vivos é de suma importância para sua sobrevivência (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993). A cicatrização de feridas consiste de eventos celulares e moleculares coordenados que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido, segundo Probst (1998), a ferida é caracterizada pelo rompimento da continuidade normal das estruturas. Sabe-se que, todas as feridas independentes da sua etiologia geram prejuízo ao fluxo de sangue, à sensibilidade, gerando acúmulo de debris inflamatórios e podendo apresentar diferentes graus de contaminação, como ou sem a presença de infecção (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Este trabalho possui relevância do ponto de vista técnico, científico e social visto que a *P. major*, objeto deste estudo, possui indicação na medicina popular sendo amplamente utilizado para lavagem de feridas cutâneas (COSMO *et al.*, 2007). Porém, não se encontram na literatura especializada trabalhos científicos que comprovem esta aplicação frequente na medicina popular.

Sob tais argumentos, este trabalho tem como intuito: avaliar a citotoxicidade do extrato bruto em cultivo celular; analisar o seu efeito sobre a velocidade de contração de ferida cutânea de equinos e, aprofundar e consolidar os conhecimentos empíricos por meio de ferramentas científicas e tecnológicas. Por fim, contribuir para a definição de políticas para a utilização econômica e sustentável dessa espécie pela indústria farmacêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Dados históricos revelam que as práticas relativas ao uso de plantas no tratamento de feridas existem desde os primórdios da humanidade.

Pode-se constatar que a importância das plantas para a saúde dos seres vivos reside no fato de que elas são a base da maioria dos tratamentos ministrados ao redor do mundo. O herbalista chinês Shen Nung, em 2800 a.C., listou em sua obra “Pen Ts’ao”, cerca de 366 drogas derivadas de plantas. No “Papiro de Ebers”, uma reconhecida fonte de informações sobre a civilização egípcia, podem-se encontrar registros importantes da prática da medicina egípcia onde, mais de 700 substâncias são referenciadas para tratar enfermidades, inclusive feridas. Para exemplificar esta afirmação citam-se: alho, cebola, mel, figo, óleo de oliva, óleo de rícino (óleo de mamona), aloe vera, óleo de acácia, além de vários minerais (CANDIDO, 2001; LÓPEZ, 2006).

No renascimento, descobriram-se remédios à base de ervas através da cura para inúmeras doenças, a partir da observação dos resultados obtidos. Na idade industrial e moderna, a ciência levou ao desenvolvimento o assunto ervas, sintetizando partes das plantas em dosagens concentradas. Mesmo com os avanços científicos nas áreas da biologia e da química nos séculos XVIII, XIX e início do XX, os medicamentos baseados em extratos não processados de plantas continuaram dominantes nos tratamentos medicamentosos até a Segunda Guerra (HOERNER, 2009).

Com a ecologia incentivando uma volta ao uso de medicamentos naturais, está acontecendo um renascimento fantástico da utilização das ervas.

Yunes *et al.* (2001A) afirmaram que a Fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, sendo que em 2001 o mercado mundial de fitoterápicos girava em torno de 22 bilhões de dólares. Em 2010 esta estimativa dobrou alcançando a soma de 44 bilhões de dólares segundo a consultoria Analize e Realize (MIOTO, 2010). Ressalta-se que o Brasil deixa de gerar cerca de cinco bilhões de dólares por ano, por não conseguir transformar a sua flora em remédios.

“... essa é a diferença entre o valor movimentado pelo time do mercado brasileiro de Fitoterápicos e por mercados como o francês, o japonês e o alemão – países com uma biodiversidade muito menor que a brasileira, mas que tiveram sucesso na transformação de moléculas de plantas em medicamentos” (MIOTO, 2010).

O autor chama atenção ainda para o fato de que até hoje, só um fitoterápico baseado na flora brasileira foi desenvolvido em território nacional. Trata-se do anti-inflamatório *Acheflan*[®] cujo princípio ativo foi extraído da erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), típica da Mata Atlântica: seu desenvolvimento durou sete anos e foi fruto de parceria público-privada. Os pesquisadores acreditam que o Brasil por ser o país dono da maior biodiversidade do planeta, detendo aproximadamente um terço da flora mundial, deveria ter um papel de liderança na área. Muito disto se deve a falta de interesse de investidores devido às leis contra a biopirataria que burocratizam excessivamente seus trabalhos, dificultando o acesso à flora do país; e a falta de biotérios que possam oferecer camundongos de qualidade para testes de medicamentos (MIOTO, 2010).

Bieski e Júnior (2004) em seu trabalho sobre o marketing das plantas medicinais relatam importantes feitos históricos, tais como o fato de que do oriente médio herdamos uma coleção de plantas inscritas na Farmacopéia Babilônica abrangendo 1400 plantas. Os “Papiros de Ebers” do Egito foram um dos herbários mais antigos que se tem conhecimento, datado de 1550 a.C., e ainda encontram-se em exibição no Museu de Leipzig, 125 plantas e 811 receitas. Enquanto que, na Grécia, os gregos adquiriram seus conhecimentos de ervas oriundas da Índia, Babilônia, Egito e até da China. Na Idade das Trevas, na Europa os processos foram dificultados pela Igreja, que não via com bons olhos a aprendizagem científica, e encaravam a doença com um castigo; a medicina das plantas restringiu-se aos monges nos mosteiros e a algumas mulheres de aldeias remotas.

Bieski e Júnior (2004) concluíram em seu trabalho, sobre o Marketing das plantas medicinais na Saúde Pública, que 95,9% dos entrevistados da cidade de Cuiabá opinaram positivamente quanto ao uso de plantas medicinais na saúde pública, 80% praticam a automedicação com ervas, 45,6% cultivam nos quintais e 20% pensam que elas têm menos efeitos colaterais.

Apesar das indústrias farmacêuticas produzirem expressivo número de antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, é incerta. Visto

que, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos, torna-se urgente adotar, portanto, medidas de enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de antibióticos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sintéticos e naturais (NASCIMENTO *et al.*, 1990). O uso de extratos vegetais e bioativos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Desenvolveram-se inúmeros estudos, em diferentes países, para comprovar a sua eficácia (NUNAN *et al.*, 1985; ANNAPURNA *et al.*, 1999; DJIPA *et al.*, 2000; FERESIN *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2001; RAMESH *et al.*, 2002).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (NASCIMENTO *et al.*, 1990). Substâncias antibióticas presentes em plantas podem ser detectadas pela observação do crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos ou extratos destas plantas. Para detectar estas substâncias são usados vários métodos, que se diferenciam na sensibilidade ou em seus princípios. Os resultados obtidos serão influenciados pelo método escolhido, assim como pelos microrganismos usados nos testes. A parte da planta utilizada também interfere nos resultados bem como a forma de uso: suco, extrato (extração por água ou outros solventes) ou óleo essencial (SKINNER, 1955).

De acordo com Batalha *et al.* (2002), a cadeia produtiva das plantas aromáticas e medicinais no Brasil ainda é muito dominada pela atividade extrativista, realizada de forma predatória nas escassas áreas naturais de floresta e cerrado que ainda existem nos Estados do Sul, Sudeste e Centro-oeste. No entanto, a área de cultivo vem aumentando, especialmente em algumas regiões tradicionais de cultivo como o Estado do Paraná. Em São Paulo, várias iniciativas foram registradas, mas a única cultura mais desenvolvida é o urucuzeiro (*Bixa orellana*), para a produção de corantes, cultivo praticado por quase 300 produtores paulistas, segundo levantamento por unidades de produção da CATI (CATI, 2001).

Espécies exóticas de importância econômica como a menta (*Mentha* sp.), a alcachofra (*Cynara* sp), a erva-de-bicho (*Polygonium* sp) e o neem (*Azadirachta*

indica) vêm tendo suas características fitotécnicas avaliadas, para dar suporte a agricultores interessados na exploração econômica de plantas medicinais.

2.1 HISTÓRICO DE FITOTERÁPICOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Várias pesquisas já avaliaram o emprego tópico de inúmeros fitoterápicos com o objetivo de influenciar o processo cicatricial, com resultados variados. Contrera *et al.* (1985), testaram a tintura mãe de raízes de arnica-da-serra-dourada (*Lichnophora ericoides*), de papo-de-perú (*Aristolochia esperanzae*) e de falsa-arnica (*Solidago microglossa*) no tratamento de feridas cutâneas em ratos, apresentando retardo na cicatrização das mesmas. Eurides *et al.* (1995/1996), testaram a solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) na evolução cicatricial de feridas cutâneas em dorso de camundongos. Os resultados mostraram que esta solução apresentou eficiência no auxílio da reparação cicatricial das feridas dos mesmos.

Santos *et al.* (2006), utilizaram o extrato bruto de jatropa (*Jatropha gossypifolia* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. No aspecto macroscópico o resultado do grupo de jatropa foi semelhante ao controle, mostrando melhora comparativa na cicatrização no aspecto microscópico com o extrato.

Alecu *et al.* (2007), avaliaram o efeito dos medicamentos homeopáticos arnica (*Arnica Montana* L.) e erva dos piolhos (*Daphinum staphisagria* A. Gray) no tempo de cicatrização de incisões cirúrgicas em ratos e concluíram que os medicamentos homeopáticos, quando administrados precocemente no período pós-operatório, tiveram um efeito significativo na redução do tempo necessário para a cicatrização do ferimento cirúrgico nos ratos.

Vitorino Filho *et al.* (2007), avaliaram o uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas e concluíram, após análise macroscópica e microscópica descritiva do processo cicatricial, que a utilização de pomada formulada com pó obtido a partir de sementes de jaqueira, não acelerou a cicatrização de feridas limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*, em camundongos. Os autores concluíram, ainda, que um estudo com um maior número de repetições por grupo, a análise do progresso da

cicatrização transcorrido um maior período de tempo após a cirurgia e a utilização de diferentes formulações seria de grande relevância para fornecer subsídios adicionais para a questão.

Santos *et al.* (2006), propuseram avaliar a ação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos e concluíram que não houve alteração no processo de cicatrização do estômago, considerando os resultados da avaliação macroscópica, tensiométrica e microhistológica. Enquanto que Branco Neto *et al.* (2006), avaliaram o extrato hidroalcoólico de aroeira no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos e concluíram que o extrato retardou o processo de reepitelização, quando comparado seus efeitos com o uso de solução salina.

Garros *et al.* (2006), avaliaram a cicatrização de feridas abertas em ratos com a aplicação tópica de extrato hidroalcoólico de maracujá (*Passiflora edulis*) e concluíram que o uso tópico do extrato não apresentava, macroscopicamente, efeito significativo na cicatrização de feridas na pele de ratos; entretanto microscopicamente apresentava aumento da proliferação fibroblástica no 7º. dia e colagenização maior no 14º. dia de pós-operatório, eventos fundamentais para cicatrização.

Nitz *et al.* (2006), em estudo morfométrico do processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando extratos aquosos de mentruz (*Coronopus didymus* L.) e calêndula (*Calendula officinalis* L.) relataram que o extrato de mentruz mostrou-se eficiente no processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar, uma vez que promoveu um aumento, estatisticamente significante, do número de fibroblastos e fibras colágenas. Enquanto que o extrato de calendula, apesar de proporcionar um maior número de fibras colágenas e fibroblastos que o grupo controle, não apresentou diferença estatisticamente significante.

Coca e Abrão (2007), avaliaram o efeito da lanolina na cicatrização dos traumas mamilares em humanos e apesar das limitações na obtenção de uma amostra maior, o estudo permitiu concluir que o uso da lanolina anídrica foi favorável no tratamento das lesões mamilares, acelerando o processo de cicatrização. Dessa forma, a lanolina pode ser indicada para tratar os traumas mamilares, e contribuir para diminuir às dificuldades apresentadas pela puérpera no processo de amamentação. Porém, outros estudos deverão ser realizados para discutir os tipos e gravidade das lesões e sugerir tratamentos específicos.

Entre os produtos de interesse clínico-dermatológico, merecem destaque os de ação tópica incorporada nas formas farmacêuticas, especificamente os que podem permitir o restabelecimento da integridade da pele após agressões de diferentes naturezas.

Apesar da predominância da terapêutica com substâncias sintéticas, na última década, observa-se uma valorização das práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como empíricas, inclusive a lenta reincorporação das ervas medicinais como alternativa ou complemento terapêutico. Neste período, vários foram os fitoterápicos testados e usados no processo de cicatrização de feridas cutâneas, que se mostraram promissoras como a babosa (*Aloe vera* L.) nos tratamentos de feridas cutâneas abertas em ratos diabéticos e normais (CONTRERA, 1985). O extrato alcoólico de flores de ixora, icsória ou ixora-coral (*Ixora coccinea*) facilitou os fatores da cicatrização, com aumento da granulação, força de tensão e deposição de colágeno em feridas cutânea de ratos (GOTTRUP, 1980). A solução de papaína a 2% também apresentou resultados animadores em feridas cutâneas em ratos (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993). Tal qual o estudo de Garros *et al.* (2006), com uso do extrato de maracujá na cicatrização de feridas de ratos.

Destaca-se também, o estudo sobre o efeito da babosa na cicatrização de feridas cutâneas em ratos (CHITHRA *et al.*, 1998 apud SOUZA *et al.*, 2006), em que obtiveram redução de até 23% no tempo de cicatrização em feridas tratadas com esta planta, em relação às feridas não tratadas. Segundo Solórzano *et al.* (2001) no extrato de trigo (*Triticum vulgare* L.) são encontradas fitoestimulinas, que ativam fenômenos da cicatrização ao estimularem a mitose e a motilidade dos fibroblastos, além de amplificar a capacidade dos fibroblastos de síntese de glicosaminoglicanas e fibras colágenas, elementos importantes para o processo de cicatrização tecidual.

Vieira *et al.* (2008), investigaram a ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar e concluíram que os resultados da cicatrização com creme de chá verde (*Camellia sinensis*) e própolis a 20%, não foram melhores que os tratamentos a base de solução fisiológica e creme base. Comparando os tratamentos não houve diferença nos processos de cicatrização nos animais, apesar dos animais tratados com chá verde e própolis evoluírem melhor durante o tratamento. As considerações finais

apontaram a necessidade de novos estudos a respeito das ações farmacológicas dos flavonóides e estudos de dose/efeito, para que a população esteja cada vez melhor informada e possa fazer uso de produtos naturais com mais segurança e eficácia.

Outros estudos, relevantes, foram realizados na tentativa de detectar a eficácia da fitoterapia na cicatrização de feridas em humanos e diversas espécies animais (FORO, 1988; COELHO *et al.*, 2001; CAPO *et al.*, 2004), sendo possível destacar as pesquisas com óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) (POSSA *et al.*, 2007), a papaína (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993), o açúcar (PRATA *et al.*, 1988), o barbatimão (EURIDES *et al.*, 1995/1996), o maracujá (GARROS *et al.*, 2006), a babosa (*A. vera*), confrei (*Symphytum officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), jojoba (*Simmondsia chinensis* L. Schneider), própolis (substância resinosa produzida pelas abelhas) (STASHAK *et al.*, 2004) e babosa, açúcar e mel (DART *et al.*, 2005) e óleo de semente de girassol (*Helianthus annus*) (OLIVEIRA JÚNIOR, 2010).

2.1.1 Fitoterápicos e a Cicatrização de Feridas em Equinos

Em equinos são muitas as preparações tópicas usadas, porém várias ineficientes, quando não contraindicadas à cicatrização, por provocarem irritações ou estimularem a formação de tecido de granulação amplificada (WHITE, 1995). Dentre os experimentos descritos em equinos destacam-se as citações de Souza *et al.* (2006), que estudou a aplicação de creme à base de trigo na cicatrização de feridas cutâneas e de Martins *et al.* (2003), que compararam o uso de barbatimão, calêndula e confrei na cicatrização de pele.

Ribeiro *et al.* (2009), avaliaram o uso tópico de ketanserina, que é protótipo de uma série de antagonistas da serotonina que bloqueiam competitivamente e seletivamente os receptores S₂, antagonizando os eventos mediados por esses receptores, na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. Ao final do experimento, afirmaram que a aplicação tópica do produto à base de ketanserina utilizado (Vulketan gel®), não produziu resultados significativos como promotores de cicatrização de ferida cutâneas induzidos em equinos. Oliveira Júnior (2010) procurou demonstrar os efeitos do uso tópico do óleo de semente de girassol no tratamento de feridas cutâneas experimentalmente induzidas, buscando novas alternativas para a cicatrização de feridas por segunda intenção em equinos e

concluiu que a aplicação tópica do óleo de girassol nas feridas beneficiou o processo de cicatrização.

2.2 *Persea major* L.E. Kopp - PAU ANDRADE

A espécie *P. major* L.E. Kopp é uma árvore da família Lauraceae, é conhecida popularmente como pau-andrade, abacateiro-do-mato e massaranduba. Essa taxonomia consta na lista da flora ameaçada de extinção no estado de São Paulo e, no Rio Grande do Sul como criticamente em perigo. É nativa do Brasil e do México e das florestas ombrófilas densas, altomontanas e semidecíduas da Floresta Atlântica, do cerrado, bem como das restingas, matas ciliares e matas paludosas (ORLANDO *et al.*, 2006).

“A família Lauraceae Ness é distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, especialmente nas florestas centro e sul-americanas, é constituída por mais de 50 gêneros e cerca de 2500 espécies. No Brasil, ocorrem 19 gêneros e cerca de 390 espécies. A grande maioria deste grupo de vegetais é constituída por plantas lenhosas e arbóreas e os gêneros principais são: *Aniba*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Persea* e *Cinnamomum*. Além de larga procura no comércio do abacate (*Persea americana*), e do importante comércio de importação da canela (a maioria das espécies dessa família são também chamadas de canela), possui numerosos representantes que fornecem madeira de excelente qualidade, como as dos gêneros *Mezilaurus*, *Phoebe*, *Nectandra* e *Ocotea*. Na medicina popular apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças. A maioria das espécies da família Lauraceae é rica em metabólitos secundários pertencentes a diversas classes como: neolignanas, lignanas, alcalóides e sesquiterpenos, sendo ainda, algumas espécies ricas em óleos essenciais. Entretanto, existem inúmeras espécies que não tiveram seus estudos químicos e farmacológicos realizados” (ORLANDO *et al.*, 2006).

A *P. major* é uma espécie nativa da América do Sul, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais (MARANHO, PREUSSLER E ROCHA, 2009). No Brasil sua distribuição abrange o nordeste, sudeste e sul, com domínios no serrado e floresta atlântica (QUINET *et al.*, 2011). No Paraná, é encontrada preferencialmente na Floresta Ombrófila Mista (Capões com *Araucaria angustifolia* (Bertol O. Kuntze)), embora possa ser encontrada também na Floresta Estacional Semidecidual (Mata Ciliar) e na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) e na formação montanhosa (FOTOGRAFIA 1).

Correa (1926/1978) e Rizzini e Mors (1976), citaram que o uso de *P. major*, tem utilidade em tabuados em geral, ou seja, sua excelente madeira é própria para construção civil, marcenaria e, construção de móveis e até de canoas escavada em tronco inteiro.



FOTOGRAFIA 1 – EXEMPLAR DA ÁRVORE DE *Persea major*

FONTE: O autor (2009).

O produto da maceração de sua casca é empregado na medicina popular na cicatrização de ferimentos (MARANHO, 1998).

Gottlieb (1972) relatou que espécies do gênero *Persea* caracterizam-se pela presença de alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos, flavonoides (canferol e canferol-3-ramnosídeo, quercetina e quercetina-3-ramnosídeo, flavan-3,4-diol: leucocianidina e flavan-3-ol:(±)-catequina). O referido autor destacou ainda, que a *P. americana* é o representante mais importante da família Lauraceae, tendo o seu fruto um produto de relevado valor econômico, sendo utilizado principalmente como alimento. O mesmo autor, chama atenção, ainda, para fato de que a sua utilização do óleo abacate como matéria-prima na indústria de cosmético.

Os trabalhos de Maranhão (1998), Maranhão *et al.* (2001) e Siever *et al.* (2007) contribuíram significativamente para o conhecimento botânico, fitoquímico, farmacológico e microbiológico dessa planta. Os estudos microbiológicos utilizando os extratos hidroalcoólicos das folhas e cascas pelo método de difusão em ágar

demonstraram atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*. No entanto, Maranhão (1998), não considerou os resultados como conclusivos, recomendando mais estudos para determinar a potencialidade terapêutica do extrato. Ainda como resultados, a autora registrou a presença de ácidos graxos, aminogrupos, esteroides e/ou triterpenos, além da presença de glicosídeos flavônicos, glicosídeos antraquinônicos, glicosídeos antociânicos, traços de glicosídeos saponínicos e taninos hidrolisáveis e taninos condensados comuns a todas as partes vegetais estudadas, e, na raiz e sua casca a presença de cumarinas. Ainda, referenciou que na determinação da atividade cicatrizante não se observa diferença significativa entre as variadas formas de aplicação destes, e que houve ligeira aceleração do processo de cicatrização quando comparados padrão e controle, sendo enfática ao sugerir que o experimento seja refeito com maior número de animais.

Em análises recentes, Sieben (2012), constatou presença de taninos condensados e hidrolisados nas cascas da espécie, os quais foram doseados de acordo com métodos farmacopêicos (F. B., 4ª (1988) e 5ª edição (2010), com modificações), a concentração de taninos totais presente no material vegetal foi de 3,41 g% em equivalentes de pirogalol, com variação de $\pm 0,59$ g%.

Devido às elevadas concentrações de taninos presentes nessa espécie, vale destacar as bioatividades destes metabólitos.

2.2.1 Taninos

São compostos fenólicos hidrossolúveis com peso molecular entre 500 e 3000 Da, que formam complexos insolúveis com alcaloides, gelatina e outras proteínas, precipitando-os. São caracterizados em dois grupos, os condensados e os hidrolisáveis. O primeiro grupo forma-se a partir da condensação de unidades de flavonoides; o segundo a partir da união de moléculas de ácido gálico e uma molécula de açúcar. Os taninos são substâncias químicas complexas, com atividades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres. Têm a propriedade de precipitar proteínas, além de contribuírem para formar uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, atuando em processos inflamatórios, causando uma reestruturação do epitélio e a neovascularização (SIMÕES *et al.*, 2010).

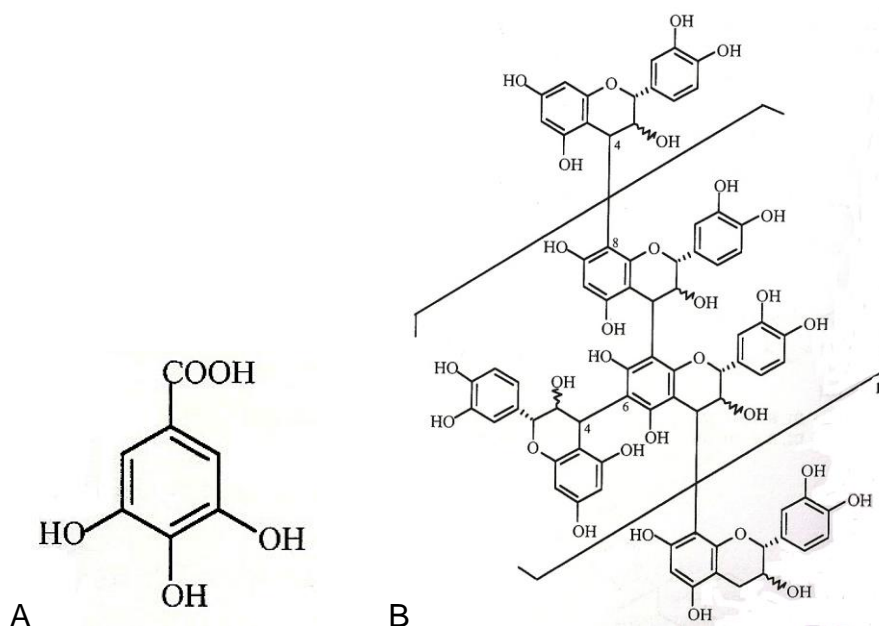


FIGURA 1 - (A) TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO; (B) TANINO CONDENSADO – PROANTOCIANIDINA.

FONTE: CUNHA (2010, p. 293 - A, p. 302 - B).

São conhecidos por curtir as peles, tornando-as pouco permeáveis, de acordo com essa propriedade, são utilizados em processos de ferida, queimaduras e inflamação, por formar uma camada protetora sobre o tecido lesionado. Apresentam atividades fungicida, bacteriostática e antiviral, por meio de inibição enzimática, sendo utilizados em casos de úlcera gástrica; além disso, possuem atividades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres, sendo aplicados em casos de doenças degenerativas (SIMÕES *et al.*, 2010).

A adstringência característica dos taninos e a formação de complexos com as fibras de colágenos da pele podem ser explicadas por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre esses e macromoléculas. A estabilidade desses complexos está diretamente relacionada ao tamanho molecular dos taninos e ao número de ligações formadas. A distribuição vegetal dos taninos é ampla, uma vez que são estruturas de caráter altamente heterogêneo. Pode ocorrer na mesma planta sob as formas hidrolisável e condensada, sendo encontrados geralmente em folhas, frutos, cascas e madeiras. São empregados na indústria têxtil e de corantes, na indústria alimentar para clarificar vinhos, cerveja e também como antioxidantes (CUNHA, 2010).

Assim, como são conhecidas as ações antitumorais e anticarcinogênica, os taninos tem efeitos inibidores de tumores, pela formação de radicais livres estáveis, inibem a peroxidação de lipídios e outras substâncias. São usados como agentes antimicrobianos em geral (fungicidas e antibacterianos), como antitermitas, como reguladores de crescimento e germinação de plantas (DUTRA, 1997).

Para Martinez (1996), os grupos condensados unem-se mais aos cátions metálicos, como íons férricos formando quelatos, que se caracterizam pela sua estabilidade, propriedades redutoras e que seus extratos possuem caráter ácido, o que permite a diluição do metal existente nas camadas de óxidos superficiais, para a formação dos quelatos.

O conceito mais moderno propõe algo abrangente: fenóis poliméricos de plantas (ligninas e taninos condensados) são atacados oxidativamente por microrganismos, indo a compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, que são convertidos a quinonas. As quinonas polimerizam formando compostos húmicos. Essa teoria é reforçada pela presença de unidades floroglucinol, que não são encontradas em lignina, e sim fazendo parte de taninos condensados, em húmus (SILVA, 1999).

2.3 O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização envolve a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação da cicatriz, estando associada à intensa remodelação. A medicina complementar vem sendo utilizada como alternativa para o seu tratamento (SANTOS *et al.*, 2006; MANDELBAUM *et al.*, 2003; ROCHA, 2006).

O histórico acima demonstra a preocupação do homem para exploração da biodiversidade com a finalidade de promover o tratamento e a cura de males, dentre eles, o tratamento de feridas. A cura ou reparação de feridas corresponde ao processo de cicatrização, que pode ocorrer por primeira intenção, quando há união imediata das bordas ou por segunda intenção, quando as bordas ficam separadas e há necessidade de formação de um tecido chamado cicatricial (HOWEL e MAQUART, 1991).

O processo de cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reepitelização e a reconstituição dos tecidos. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM *et al.*, 2006; CONTRAN *et al.*, 2012).

Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual o fisiologismo volta-se completamente para o reparo de um evento danoso ao organismo. A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. É daí que vem a definição do tipo de ferida.

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização.

2.3.1 Fases do processo de cicatrização

Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: inicialmente um estágio inflamatório (FIGURA 2), seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (ORGILL e DEMLING, 1988; BERTONE, 1989; KENT LLOYD, 1992; FITCH e SWAIM, 1995).

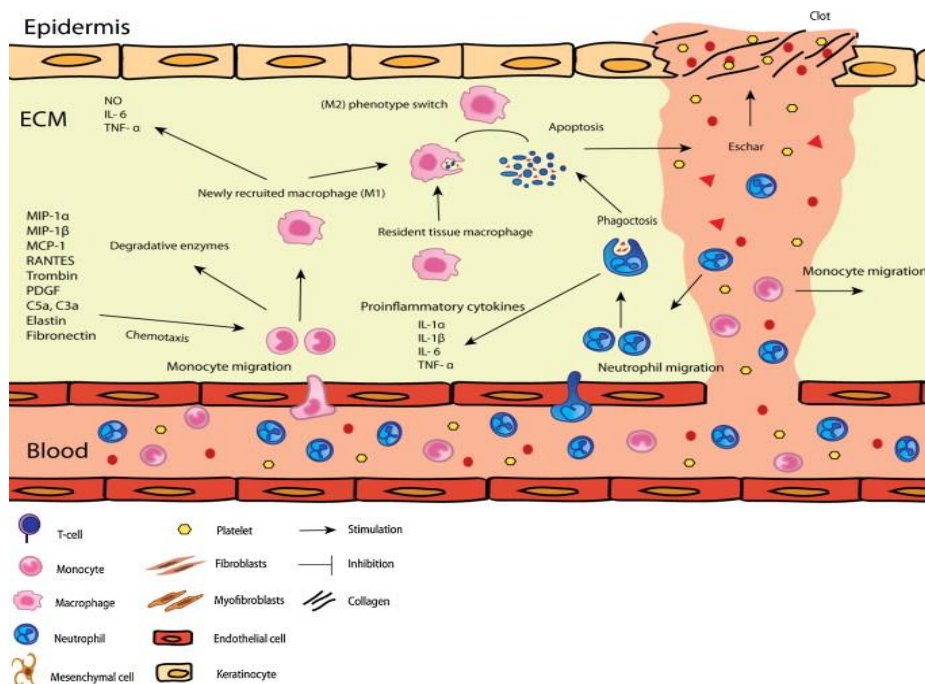


FIGURA 2 – FASE INFLAMATÓRIA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.

FONTE: DELAVARY *et al.*, 2011.

Destaca-se que em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente, permitindo assim o sucesso da cicatrização. Considera-se, ainda, que a cicatrização pode ocorrer por primeira, segunda intenção ou ainda por fechamento primário tardio, na dependência do tipo de ferida, localização, contaminação e viabilidade do tecido envolvido (KENT LLOYD, 1992).

Assim sendo, a cicatrização se inicia com a perda de integridade da pele, gerando uma solução de continuidade com resposta inflamatória quando ocorre o aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração de leucócitos para a região lesada (KENT LLOYD, 1992). Portanto, a fase inflamatória é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) que migram para a área de lesão, fatos importantes para liberação de substâncias biologicamente ativas (WILMINK e VAN WEEREN, 2004) (FIGURA 2).

Entretanto, na fase proliferativa (FIGURA 3), temos a migração de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, resultando na nova epitelização, a formação de tecido de granulação e angiogênese (SIMÕES *et al.*, 1986). Os fibroblastos são responsáveis pela construção da matriz extracelular com a formação de coágulos de fibrina e com os vasos sanguíneos para fornecimento de oxigênio e nutrientes para os fibroblastos, com posterior substituição da rede de

fibrina com glicoproteínas (fibronectina e laminina) em proteoglicanos (ácido hialurônico) e colágeno (tipo III). Finalmente na fase de maturação, o excesso de colágeno é degradado e várias enzimas proteolíticas levam ao reparo tecidual (BERTONE, 1989; MORI *et al.*, 2004). A contração da ferida é feita através da ação dos fibroblastos diferenciados (miofibroblastos) no tecido de granulação, que contem filamentos de actina do músculo liso, ocorrendo de maneira mais pronunciada nas feridas do corpo do que dos membros (WILMINK e VAN WEEREN, 2004).

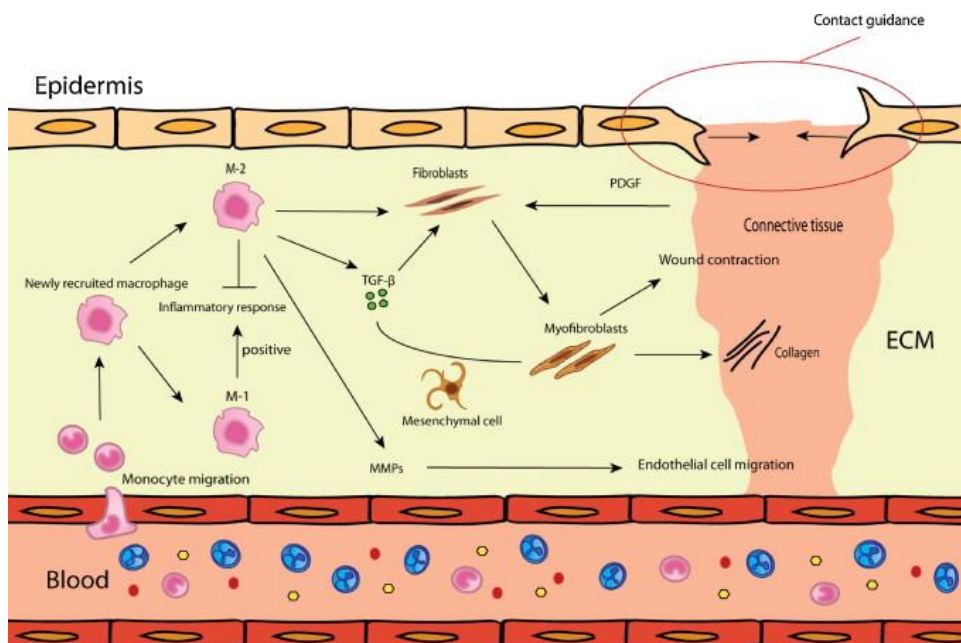


FIGURA 3 – FASE PROLIFERATIVA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.

FONTE: DELAVARY *et al.* 2011.

Os polimorfosnucleares (PMN) chegam no momento da lesão tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias; são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase (DIEGELMANN *et al.*, 1981), permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos.

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina (CLARK, 1998). Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células,

funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz (MOSHER e FURCHT, 1981). Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias.

A proliferação divide-se em três subfases, sendo responsável pelo "fechamento" da lesão propriamente dita. A primeira das subfases da proliferação é a reepitelização. Evidencia-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens nas de espessura total. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio, nesta subfase (CHRISTOPHER, 1972).

A segunda subfase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (VAN WINKLE, 1967).

A última subfase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização.

Inicialmente, as células endoteliais migram para a área ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (FIGURA 04).

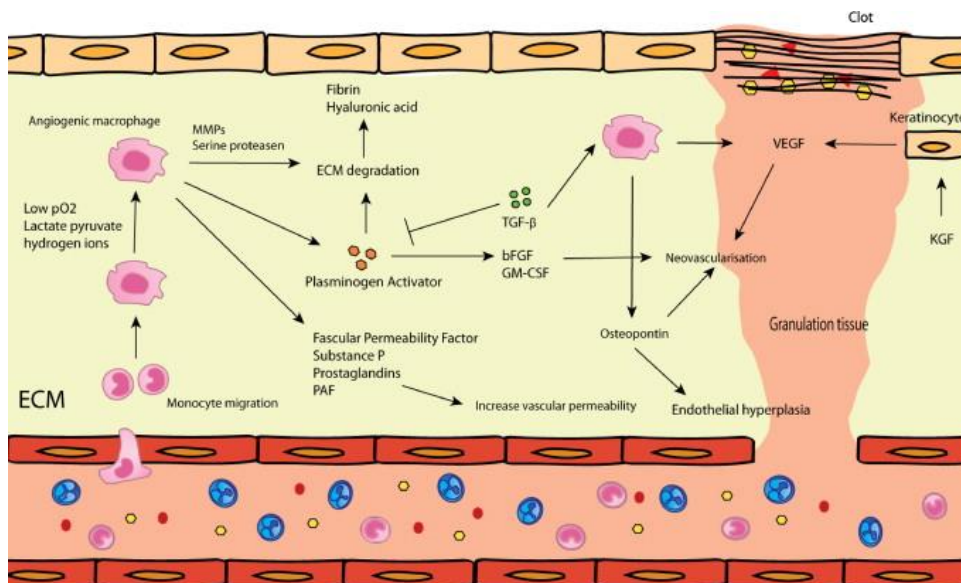


FIGURA 4 – FASE DE ANGIOGÊNESE DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.

FONTE: DELAVARY *et al.*, 2011.

A contração da ferida é caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida (STEGMAN *et al.*, 1982). Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo (LAWRENCE *et al.*, 1986).

A remodelação é a última das fases; ocorre no colágeno e na matriz; dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON *et al.*, 1985) (FIGURA 5).

A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatrização normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e, é plana (FIGURA 5).

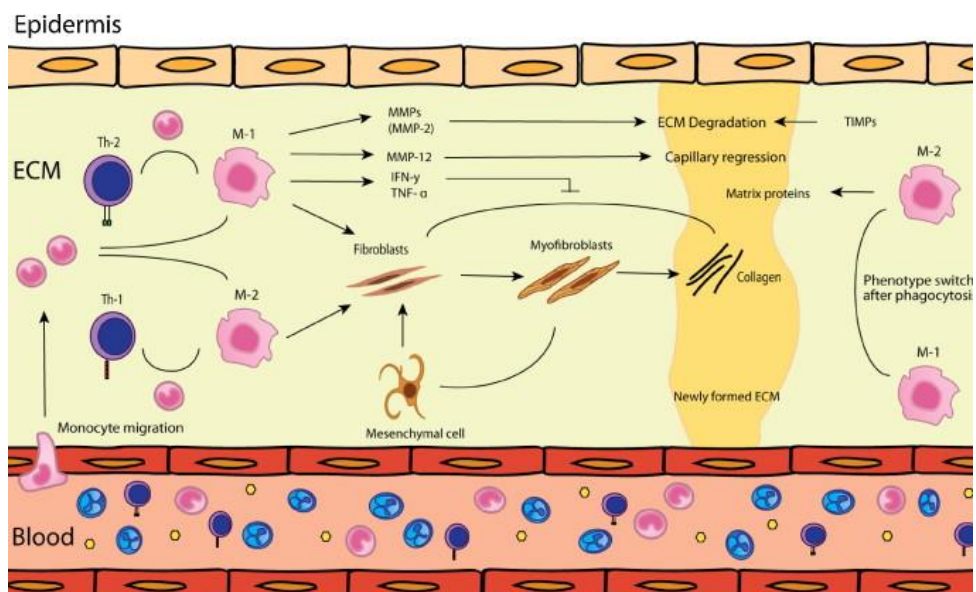


FIGURA 5 – FASE DE REMODELAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.

FONTE: DELAVARY *et al.*, 2011.

Muitas variáveis tanto de ordem geral como de ordem local influenciam esse longo e complexo processo. É fundamental uma completa e minuciosa anamnese, para avaliação de todos os fatores que podem interferir na cicatrização.

2.3.2 Cicatrização de feridas em equinos

Nos equinos as lesões cutâneas de origem traumática constituem evento rotineiro devido às características comportamentais e físicas da espécie, principalmente no que se refere a formação de tecido de granulação exuberante (OLIVEIRA, 1992). Em várias situações ocorre perda excessiva de tecido ou um dano vascular severo, o que faz da cicatrização por segunda intenção ser a única solução. Essas complicações são mais comuns nos membros locomotores do animal, visto que as feridas extensas do corpo curam-se relativamente bem. Estas complicações supracitadas conduzem a um desperdício significativo porque um número considerável de cavalos não pode prosseguir em sua carreira atlética por apresentarem membros inchados e cicatrizes extensas que comprometem muitas das vezes sua locomoção (WILMINK e VAN WEEREN, 2004).

“A natureza do cavalo, caracterizada por comportamento ativo e respostas rápidas, associado à realização de atividades atléticas, o predispõem à injúrias traumáticas, especialmente em membros. Problemas relacionados ao manejo, como pastagens sujas e instalações precárias também constituem causas importantes destes processos. Os cavalos entram em pânico em muitas situações e fazem tentativas violentas de fuga em situações de restrição ao movimento. Barulhos e ruídos estranhos, tais como os causados por trovões, estrondos de motores ou bombas e disparos de armas de fogo, assustam os equinos e fazem com que estes se atirem cegamente contra cercas e objetos sólidos, sem qualquer preservação de sua integridade física. Arames farpados constituem a causa mais comum de feridas, embora muitos outros objetos possam ser incriminados” (HANSELKA *apud* NETO, 2012).

O número e a variedade de preparações tópicas para a cicatrização de feridas em equinos é grande, sendo muitos desses produtos ineficientes, quando não prejudiciais à cicatrização, por serem irritativos ou estimularem o tecido de granulação saliente (WHITE *et al.*, 1995).

Em feridas limpas, ou seja, aquela isenta de contaminação, a cura pode ocorrer dentro de 15 dias, dependendo da extensão do traumatismo, higidez orgânica, adoção ou não de medidas terapêuticas que acelerem o processo. Nas feridas contaminadas, o período requerido para a cura é maior e o tratamento adequado é indispensável (RICHARDSON *et al.*, 1988).

2.4 Citotoxicidade *in vitro*

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization) ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO *et al.*, 2003).

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ *et al.*, 1987; ROGERO *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial do extrato bruto de *Persea major* L.E. Koop, no tratamento de feridas cutâneas de equinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O preparo e a obtenção do extrato bruto de *P. major*.

Determinar a citotoxicidade *in vitro* de extrato bruto de *P. major* em diferentes concentrações empregando células VERO-E6 .

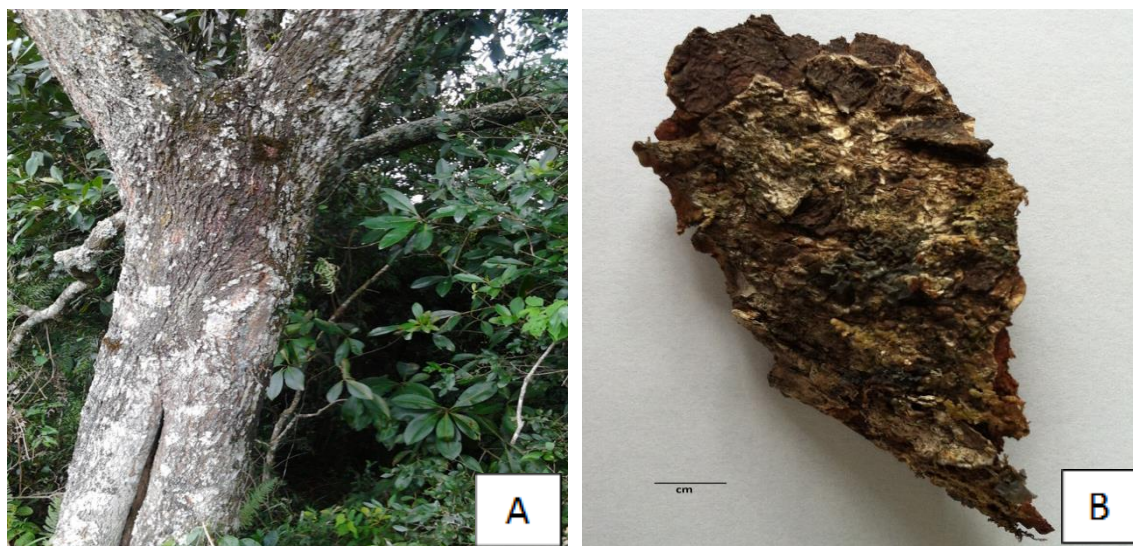
Determinar a bioatividade do extrato bruto de *P. major* como agente indutor de cicatrização de feridas cutâneas em equinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Neste estudo utilizaram-se as cascas de *P. major*, coletada em Porto Amazonas/PR, nas coordenadas geográficas de latitude 25°28'03"S e longitude 49°54'12"W, nos meses de abril, maio e junho de 2009. As exsiccatas encontram-se depositadas, sob o número 43562, no UPCB da UFPR.

Nas FOTOGRAFIAS 2A e 2B encontram-se ilustrados os aspectos do tronco e da casca de *P. major*.



FOTOGRAFIA 2 – ASPECTO DO TRONCO (A) E DA CASCA (B) DE *Persea major*.

FONTE: O autor (2009).

O extrato bruto foi obtido de 2 kg da casca da planta (FOTOGRAFIA 2B), grosseiramente fragmentada, em 5000 mL de etanol a 70% (v/v com água destilada) deixado em maceração a temperatura ambiente durante 10 dias. Decorrido esse tempo, procedeu-se a primeira filtração e, ao resíduo vegetal (marco), foi adicionado novamente etanol a 70% (q.s.p. cobrir o material vegetal) para extração em temperatura moderada (60°C) por duas horas (processo efetuado por duas vezes). Na sequência, a mistura foi filtrada e o filtrado reservado. Ao marco, foi adicionado etanol a 50% e deixado macerar por mais duas horas a temperatura moderada (60°C). A mistura foi filtrada. Ao marco, foi adicionada água destilada e levada a ebulição por uma hora, e filtrada ainda quente. O filtrado foi concentrado em

evaporador rotatório. Os filtrados anteriores foram concentrados e os extratos brutos (EB) concentrados foram congelados e guardados em baixas temperaturas.

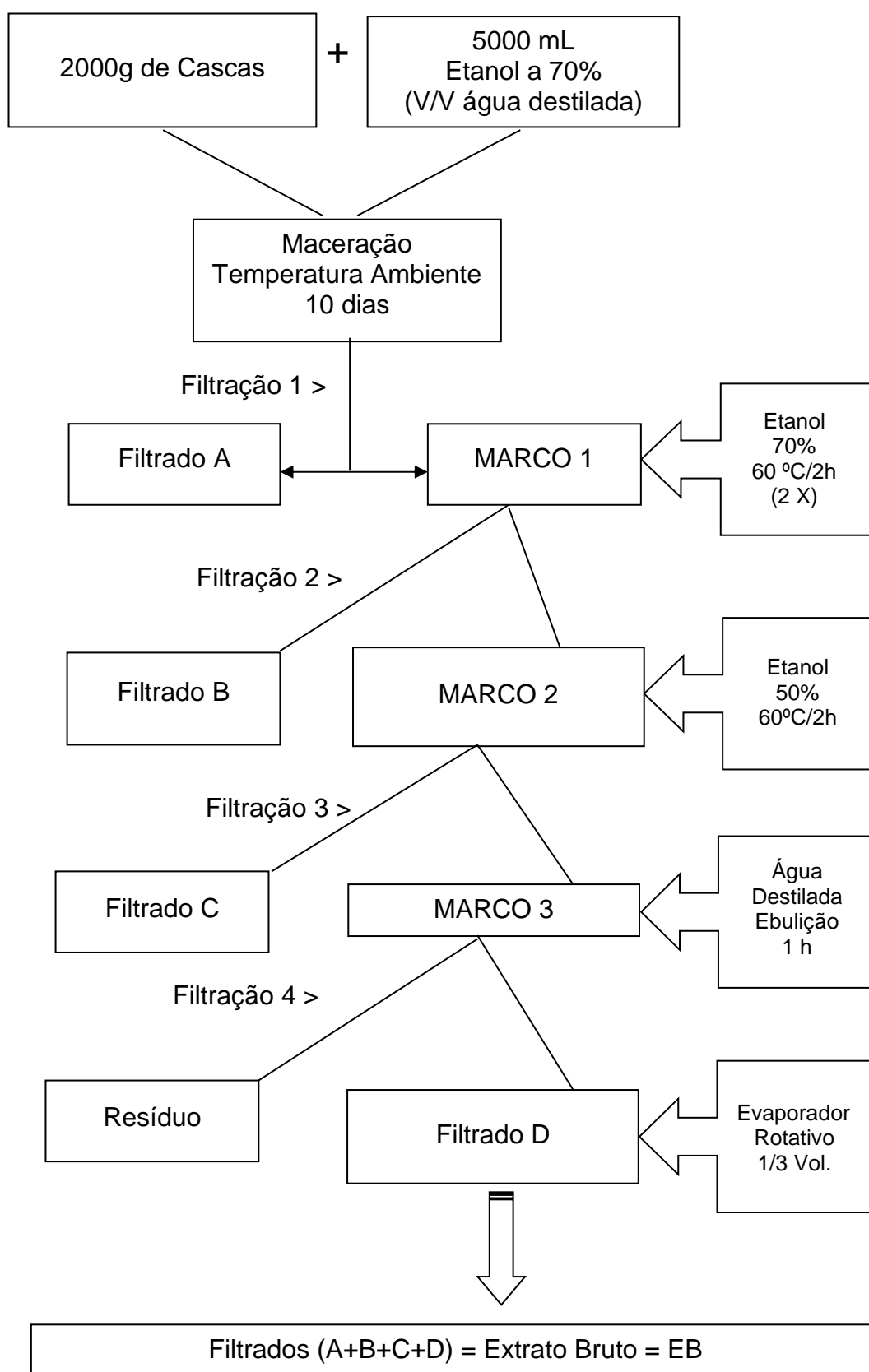


FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DE PREPARO DO EXTRATO BRUTO DE *Persea major*

4.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem celular permanente Vero-E6 (FTV6, Vircell, Granada, Espanha) cedida pelo Laboratório Estadual de Apoio ao Diagnóstico Marcus Enrietti, provenientes de rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*. A linhagem celular foi mantida em câmara de culturas a 37°C com 5%CO₂, em frascos de cultura de 25cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) com meio MEM (*Minimun Essential Medium*) suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio e 10% de FBS (*Foetal Bovine Serum*). O meio foi sempre filtrado e, antes de cada utilização, aquecido a 37°C.

A propagação celular foi realizada bi-semanalmente, sempre que as células apresentavam uma boa confluência e morfologia (confirmada por microscopia óptica). Brevemente, removeu-se o meio de cultura, lavaram-se as células com PBS (Phosphate Buffered Saline) e colocaram-se na câmara de culturas com 0,5% tripsina-EDTA durante poucos minutos, com o objetivo de desprender as células da superfície de crescimento do frasco. Na sequência, ressuspendeu-se com meio de cultura renovado e diluiu-se para novos frascos de cultura. Ressalta-se que todos os reagentes foram sempre pré-aquecidos a 37°C de modo a evitar o estresse celular provocado pela diferença de temperatura, uma vez que os reagentes são conservados a 4°C.

Adicionalmente, procedeu-se ao congelamento de células de forma a manter um estoque celular para ensaios posteriores. Para tal, inocularam-se as células em frascos de 80 cm³ (Nunc) e, após atingirem a fase de crescimento exponencial, removeu-se o meio, lavaram-se as células com PBS, tripsinisaram-se e ressuspenderam-se em meio fresco. Após centrifugação de 5 minutos a 300xg, o sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspendido em meio de congelamento (FBS+10%DMSO), colocados em criotubos e mantidos a -80°C.

Todos os procedimentos foram realizados em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar do tipo II nas dependências do Laboratório Estadual Marcus Enrietti.

4.3 EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS VERO – E6 AO EXTRATO BRUTO DE *P. major*

As células Vero, mantida tal como descrito no item 4.2, foram usadas como inóculo para a avaliação dos efeitos do extrato da casca de *P. major* em ensaios de citotoxicidade. Para os ensaios, as células Vero em crescimento exponencial foram tripsinizadas e ressuspensas em meio MEM suplementado, contadas m Câmara de Neubauer pelo método do azul de triptano (Merck®, Darmstadt, Alemanha) (SANDSTROM, 1965) e inoculadas em microplacas de 96 poços (Sarstedt, Newton, EUA). Usou-se como inóculo uma densidade celular de 5000 a 10.000 células por poço. Em todos os ensaios de citotoxicidade a viabilidade do inóculo foi superior a 95%. As microplacas foram mantidas na câmara de culturas, de 2 a 24 horas, para permitir a adesão e crescimento celular. Após este período o meio de cultura foi removido e as células em concentração mínima de 45.000 células foram expostas a diluições crescentes de base 10 de extrato de casca de *P. major* em placas de cultivo celular de 96 poços.

Para as diferentes condições de incubação, as alterações morfológicas das células foram observadas em microscópio óptico invertido de contraste de fase (Olympus CK40) e o registo fotográfico realizado com máquina fotográfica acoplada (Olympus PM-20) 24, 48 e 72 horas após o incubação.

4.4 TESTE DO VERMELHO NEUTRO

O teste do vermelho neutro (NR) baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem e capturarem este corante vital ao nível dos lisossomas. Uma vez que o NR é um corante catiônico fraco, penetra rapidamente nas células através das membranas celulares por difusão não iônica e é aprisionado intracelularmente nos lisossomos, devido ao seu conteúdo ácido. Alterações sobre a membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do NR, podendo-se assim distinguir entre células viáveis (incorporam NR, maior sinal espectrofotométrico) e inviáveis (não incorporam NR, menor sinal espectrofotométrico).

O teste do NR foi efetuado de acordo com o descrito em Borenfreund e Puerner (1985), modificado por Andrade (2007), composto pelas seguintes etapas:

1. Remoção do sobrenadante das culturas de células tratadas com MC-LR pura e/ou extratos cianobacterianos;
2. Adição de 100µL de meio fresco MEM suplementado pré-aquecido a 37°C;
3. Adição de 10µL NR (Merck) a 0,5mg/mL em água, para uma concentração final de 50µg/mL;
4. Incubação em câmara de culturas durante 3 horas, até à incorporação do NR nos lisossomas;
5. Remoção do sobrenadante por inversão da microplaca;
6. Lavagem (2x) com 100µL de PBS pré-aquecido a 37°C, para retirar o excesso de NR;
7. Remoção do PBS por inversão da microplaca;
8. Registo fotográfico;
9. Adição de 100µL de etanol/CH₃COOH/H₂O (50:1:49), para extração do NR dos lisossomas;
10. Agitação da placa durante 20 minutos no escuro;
11. Leitura da absorbância a 540nm no espectofotómetro (Multiscan Ascent, Labsystems, Helsínquia, Finlândia).

4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL

Para avaliação da eficiência na indução da contração cicatricial de feridas cutâneas utilizou-se dois equinos, adultos, sem raça definida e do sexo feminino.

O primeiro animal foi atendido no HOVET (Setor de Ciências Agrárias/UFPR) com história clínica de uma ferida cutânea na região medial do membro pélvico direito decorrente de traumatismo causado por arame farpado de uma cerca divisória de piquetes da Fazenda Experimental do Canguiri/UFPR. A ferida mostrou formato e contorno irregulares, apresentando sangramento e ausência da pele. A área era de 32,39cm². O animal encontrava-se normotérmico, com escore corporal bom, pêlos com brilho regular.

O segundo animal apresentava ferida cutânea originada da remoção cirúrgica de neoplasia, com 504cm² de área, formato irregular, desprovida de pele, apresentando sangramento controlado, localizado no flanco esquerdo do pescoço. O

animal encontrava-se normotérmico, com escore corporal bom, pêlos com brilho regular.

Durante a marcha dos exames clínicos pré-tratamento foram colhidas amostras para exames complementares. Os exames realizados foram: hemograma, biopsia de pele, urinálise e coprológico. Os parâmetros fisiológico se mantiveram na normalidade ao longo do tratamento. Os animais foram mantidos em baia individual, com alimentação e água *ad libitum*.

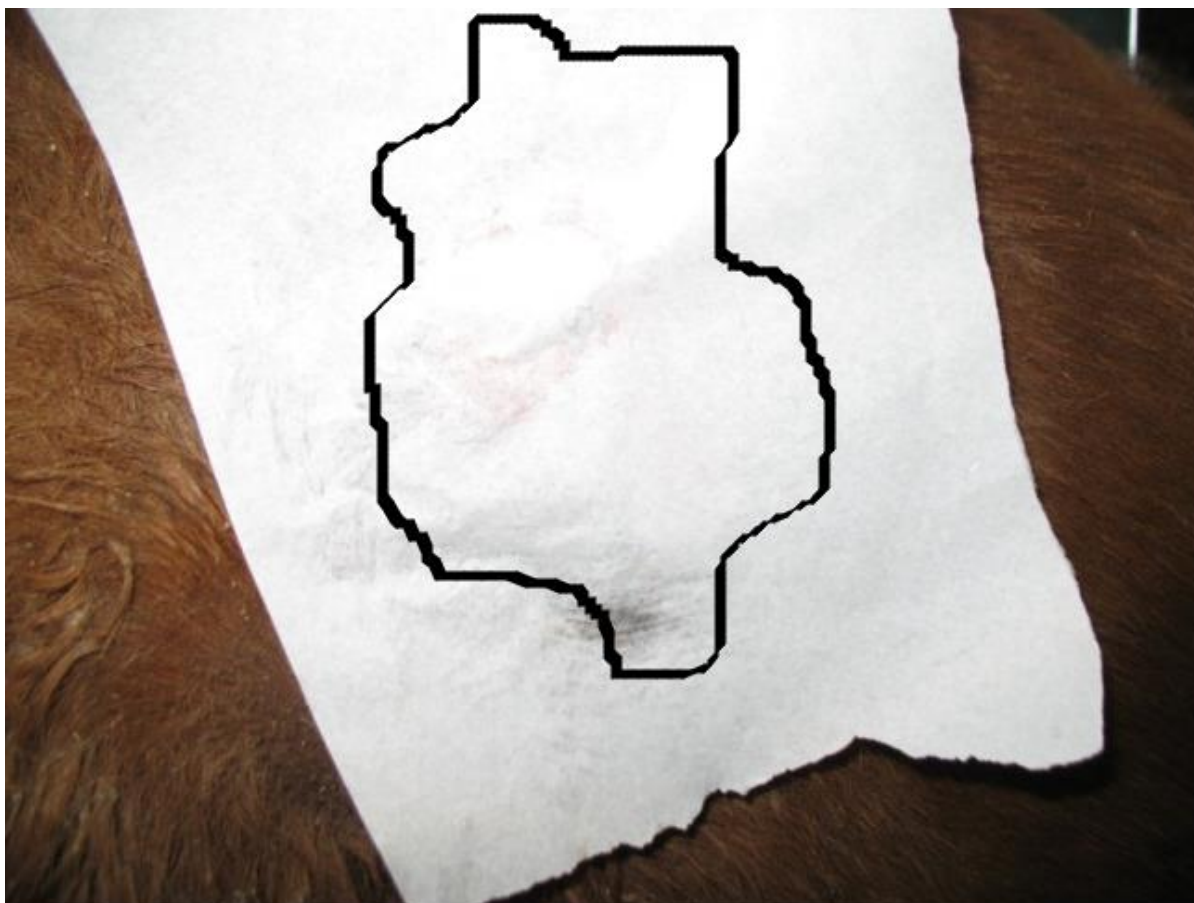
No primeiro dia do tratamento as feridas foram medidas com auxílio de uma folha de papel vegetal e caneta hidrocor com tinta preta (FOTOGRAFIA 3). A folha de papel vegetal foi posicionada sobre a ferida e o contorno da ferida foi delimitado com auxílio de uma caneta esferográfica. Em seguida foram armazenadas em pastas individuais.

As áreas das imagens projetadas nas folhas foram analisadas utilizando-se o aplicativo WinRHIZO (Regent Instruments Inc.[®]), no Laboratório de Fitotecnia do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

Avaliação macroscópica das feridas foi baseada nas observações de presença de hemorragia (SIM ou NÃO), a presença e extensão de crostas (TOTAL, PARCIAL OU AUSENTE), a presença de secreção (SIM ou NÃO) e a reepitelização (COMPLETA, PARCIAL ou AUSENTE) – APENDICE 2.

Para avaliação histológica, foram coletadas amostras de pele obtidas por dissecação da ferida com margem de 1 cm de pele integra em torno da lesão com profundidade até a musculatura. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e processadas segundo técnica de rotina para inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica e tricromo de Masson para observação de fibras colágenas.

Os parâmetros da avaliação microscópica foram a proliferação vascular, proliferação fibroblásticas, células polimorfonucleares, células mononucleares, fibras colágenas e reepitelização. Nesta avaliação foi atribuída quatro graduações: ausente, leve, moderada e acentuada. No caso da reepitelização foi ausente, parcial e completa.



FOTOGRAFIA 3 – REPRESENTAÇÃO DA DELIMITAÇÃO DA FERIDA EM FOLHA DE PAPEL VEGETAL.

FONTE: O autor. 2010.

O tratamento das feridas cutâneas resumia-se a dois curativos diários com extrato bruto da casca de *P. major*, sendo o primeiro pela manhã e outro à tarde. Antes do curativo da manhã efetuava-se o protocolo de mensuração da ferida em folha de papel vegetal (FOTOGRAFIA 3). Na sequência, efetuava-se a aplicação de 5mL do EB com auxílio de gaze estéril (FOTOGRAFIA 4) no sentido indicado pela seta. Este volume de extrato foi padronizado empiricamente.



FOTOGRAFIA 4 – APLICAÇÃO DO EXTRATO NA FERIDA (A SETA INDICA O SENTIDO DA APLICAÇÃO).

FONTE: O autor (2010).

4.6 CÁLCULO DA ÁREA DA FERIDA UTILIZANDO O WinRHIZO

O primeiro passo foi digitalizar as folhas de papel vegetal com a projeção da área da ferida obtida em cada dia do tratamento, utilizando-se um scanner acoplado em computador com o Software WinRHIZO devidamente instalado. Neste trabalho utilizou-se a resolução de 75 dpi.

4.7 BIOPSIAS CUTÂNEAS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As biopsias de pele foram obtidas no primeiro dia de tratamento (quando os animais eram recebidos no Serviço de Atendimento de Grandes Animais do HOVET/UFPR) e com 7, 14 e 21 dias após, sendo estas do limite lateral contemplando o tecido integro. Neste momento os animais eram contidos em troncos apropriados e tranquilizados com cloridrato de xilazina a 10% na dose

0,5mg/kg/IV. Os fragmentos obtidos eram acondicionados em frascos contendo solução de formalina neutra a 10% devidamente identificados com o nome do animal e a data da coleta e encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária/ SCA/UFPR para processamento e confecção das laminas histopatológicas FIGURA 07.

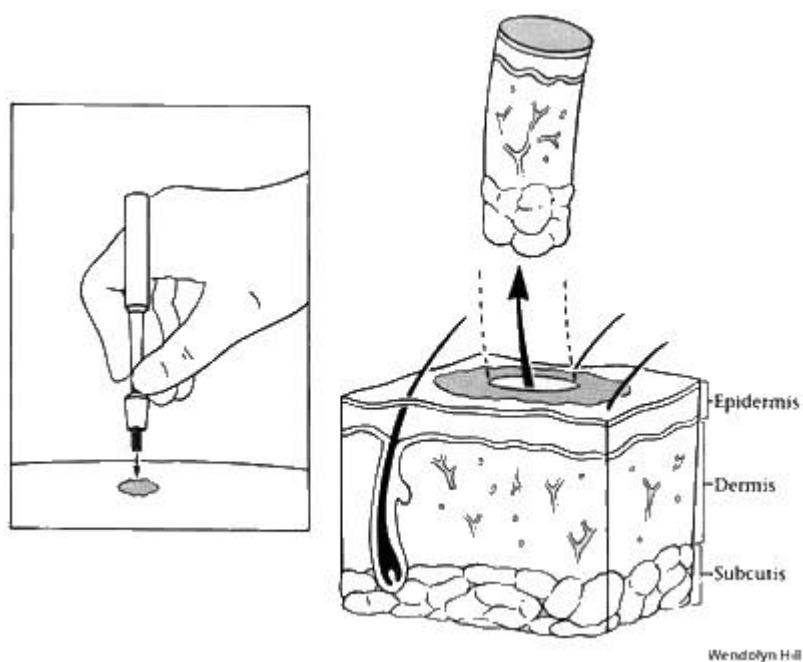


FIGURA 7 – ESQUEMA DA OBTENÇÃO DAS BIÓPSIAS DE PELE

FONTE: Disponível em <http://www.dermatopatologia.com/biopsias/biopsia.asp>.

Todo material colhido foi processado para inclusão em parafina e os cortes obtidos foram realizados com espessura de 3µm com auxílio de micrótomo (LEICA RM 2125 RT). Na sequência os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram lidas no Laboratório de Patologia Animal do HOVET/ SCA/UFPR utilizando-se microscópio da marca Olympus DX40 com objetiva de 40X para fragmentos menores e de 20X para fragmentos maiores.

4.8 DADOS EXPERIMENTAIS

O início do tratamento ocorre após o exame físico-clínico dos animais (APENDICE 1) e foi mantida diariamente, duas vezes ao dia, a primeira nas primeiras horas da manhã e a segunda no final da tarde até a cicatrização total das feridas.

4.9 ANÁLISES DE DADOS

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Excel for Windows 7® (Copyright © 2010 Microsoft Corporation). Para avaliar em conjunto os efeitos dos tratamentos semanais, e para interação entre eles foi realizada ANOVA com dois fatores para a variável numérica área (cm²). As comparações das áreas médias das feridas dos animais em cada uma das semanas de estudo foram representadas em gráfico.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Os resultados obtidos nos exames clínicos dos animais usados no experimento estão apresentados nos apêndices (Apêndices A e B). Observa-se que os parâmetros avaliados (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal, tempo de preenchimento capilar e coloração de mucosas) encontravam-se dentro dos valores de normalidade para a espécie (ROSE E HOGDSON, 2000).

TABELA 1 – NÚMERO TOTAL, TAMANHO E VIDA MÉDIA DAS HEMÁCIAS DOS DIFERENTES ANIMAIS

ANIMAIS	NÚMERO TOTAL (milhões/mm ² ou µL)	TAMANHO (µm de diâmetro)	VIDA MÉDIA (dias)
Canino	6-8	7,0	120
Felino	5-10	5,8	70
Equino	9-12	5,7	150
Bovino	5-10	5,5	160
Ovino	9-15	4,5	100
Caprino	8-18	4,0	100
Suíno	5-8	6,0	65

Fonte: Lopes, S. T. A.; Biondo, A. W. e Santos, A. P., 2007.

5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Na TABELA 1, encontram-se representados os valores médios e os respectivos desvios-padrões das feridas no período compreendido entre a semana 1 a semana 20 de tratamento.

TABELA 2 – MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DAS ÁREAS DAS FERIDAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major*

	Semana 1	Semana 5	Semana 10	Semana 15	Semana 20
Medidas cm ²	499,52 (±29,21)	200,19 (±10,75)	96,24 (±7,71)	89,54 (±4,38)	70,75 (±6,02)

Os valores médios referem-se a partir de medidas diárias da primeira semana até a vigésima semana de tratamento.

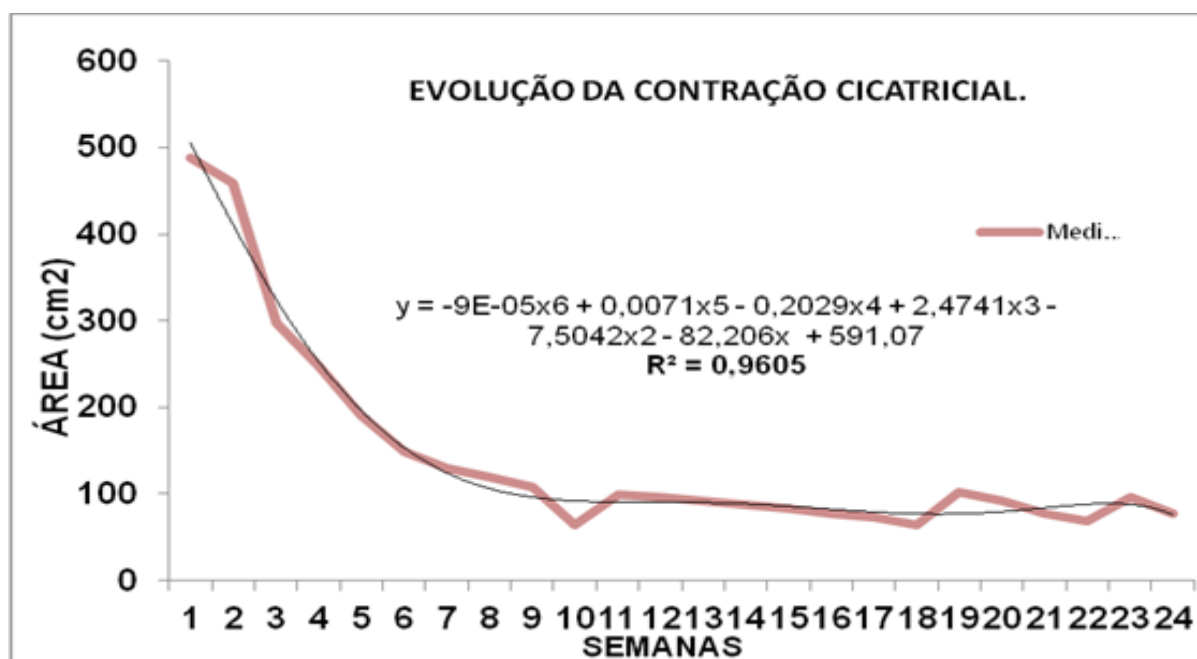


GRÁFICO 1 – COMPARATIVO DO TEMPO MÉDIO DE CONTRAÇÃO CICATRICIAL DAS FERIDAS TRATADAS EXPERIMENTALMENTE COM EXTRATO DE *Persea major*.

Além da mensuração da área das feridas foram avaliados os aspectos macroscópicos das feridas apresentadas no QUADRO 1 e ilustradas na FOTOGRAFIA 5. A maior velocidade de contração cicatricial foi observada na 10ª semana, FIGURA 5c.

MOMENTOS	ASPECTO
Semana 1	Coágulo de fibrina
Semana 5	Secreção serosa
Semana 10	Secreção serosa Crostras nas bordas das feridas Tecido de granulação
Semana 15	Tecido de granulação exuberante Crostras nas bordas da ferida

Semana 20	Tecido de granulação
-----------	----------------------

QUADRO 1 – DADOS MACROSCÓPICOS ENCONTRADOS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS DOS ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20.



FIGURA 5 – EVOLUÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL DA FERIDA DO ANIMAL 1. EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE COÁGULOS (C) E FIBRINA (F).



FIGURA 6 – A RECONSTITUIÇÃO EPITELIAL E SEUS ANEXOS (PÊLOS).



FOTOGRAFIA 7 – ILUSTRA O FECHAMENTO DA FERIDA APÓS 25 SEMANAS DE TRATAMENTO.



FOTOGRAFIA 8 – ASPECTO GERAL DA FERIDA DO ANIMAL 2 COM DESTAQUE A PRESENÇA DE COÁGULO (C) E DE FIBRINA (F).
FONTE: O autor (2010).



FOTOGRAFIA 9 – RECOMPOSIÇÃO DA PELE E ANEXOS CUTÂNEOS (PÊLOS). ANIMAL 2 COM 15 SEMANAS DE TRATAMENTO.
FONTE: O autor (2010).



FOTOGRAFIA 10 – ASPECTO MACROSCÓPICO DA EPITELIZAÇÃO DA FERIDA DO ANIMAL 2 COM 20 SEMANAS DE TRATAMENTO.
FONTE: O autor (2010).

MOMENTOS	ASPECTO
Semana 1	Coágulo de fibrina
Semana 5	Secreção serosa
Semana 10	Secreção serosa Crostras nas bordas das feridas Tecido de granulação
Semana 15	Tecido de granulação exuberante Crostras nas bordas da ferida
Semana 20	Tecido de granulação

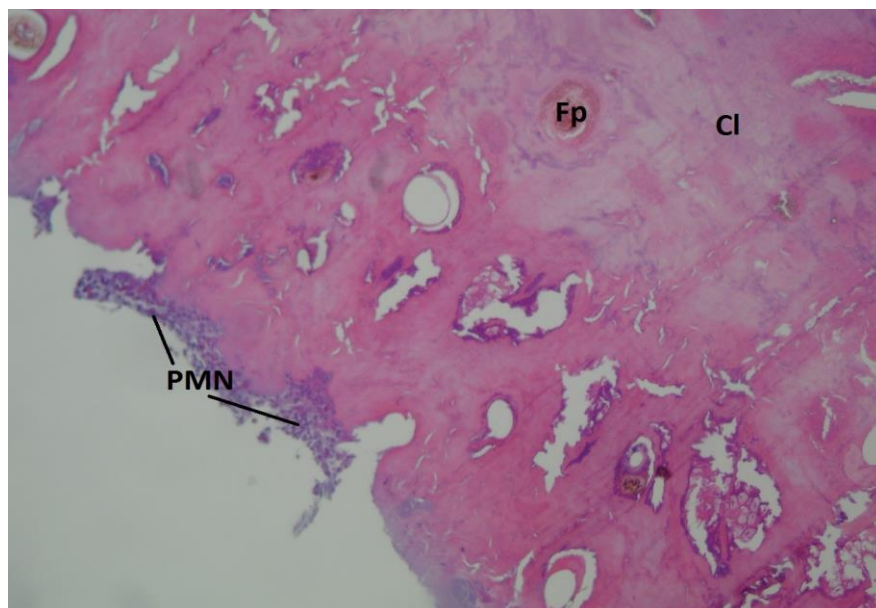
QUADRO 1 – DADOS MACROSCÓPICOS ENCONTRADOS NA AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS DOS ANIMAIS TRATADOS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS FERIDAS

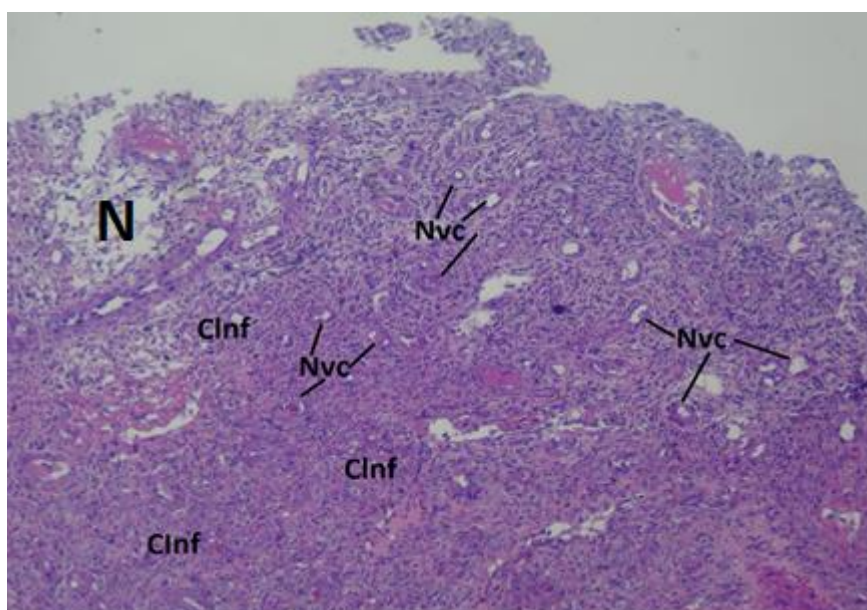
As principais alterações diagnosticadas na avaliação histopatológica das biopsias de pele das feridas cutâneas dos equinos tratados com extrato bruto de *P. major* encontram-se sumarizadas no QUADRO 2 e ilustradas nas FOTOGRAFIAS 12 a 15 para o animal 1 e FOTOGRAFIAS 16 a .

MOMENTOS	DADOS
Semana 1	Colágeno original; Folículo piloso e Glândulas sebáceas
Semana 5	Fase inflamatória da ferida; Necrose celular; Infiltrado de polimorfonucleares e Neovascularização.
Semana 10	Tecido de granulação; Fase de transição com remodelação; Colágeno frouxo; Células inflamatórias e Neovascularização.
Semana 15	Fibras colágenas; Tecido de transição com remodelação e Colágeno frouxo.
Semana 20	Neovascularização; Polimorfonucleares; Colágeno frouxo e Início da remodelação.

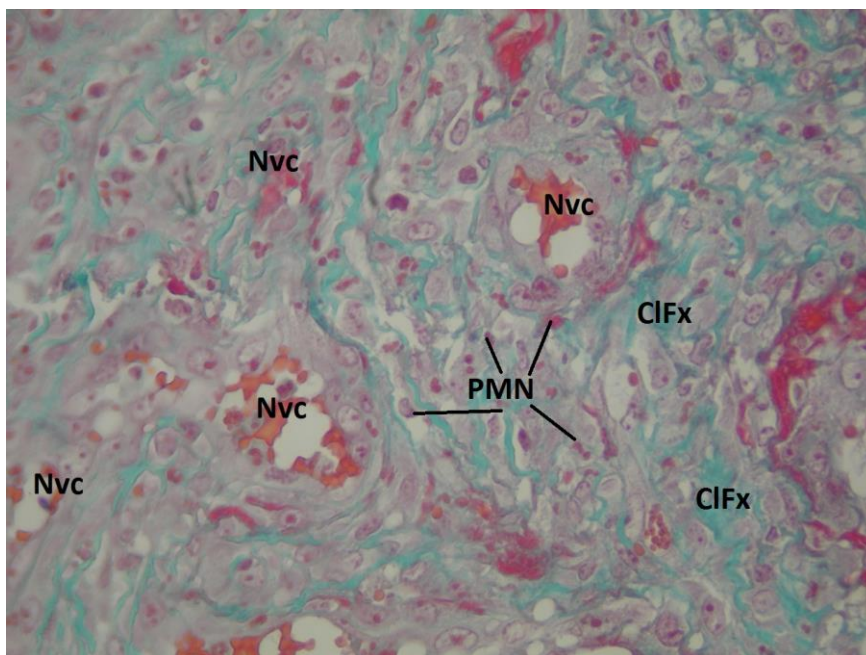
QUADRO 2 – DADOS HISTOPATOLÓGICOS DIAGNOSTICADOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20.



FOTOGRAFIA 12 – ASPECTO MICROSCOPIO DA BIOPSIA DA FERIDA CUTÂNEA TRATADA POR UMA SEMANA COM EXTRATO BRUTO DE *P. major* EM EQUINOS. COLÁGENO ORIGINAL (Cl); FOLÍCULOS PILOSOS (Fp). HE-400x. FONTE: O autor (2012).

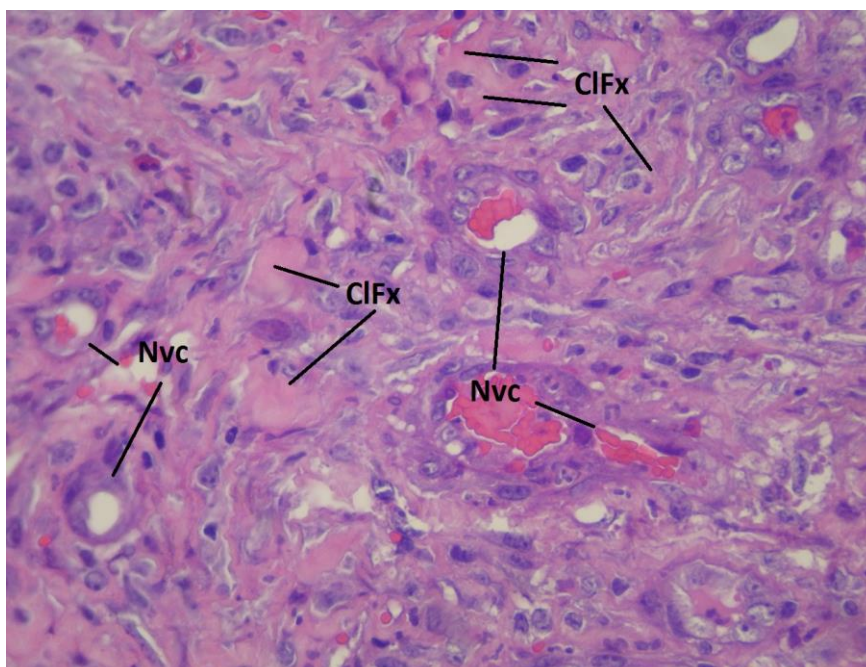


FOTOGRAFIA 13 – ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR CINCO SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE A NECROSE (N); INFILTRADO INFLAMATÓRIO (Clnf) E NEOVASCULARIZAÇÃO (Nvc). He 400X. FONTE: O autor (2012).



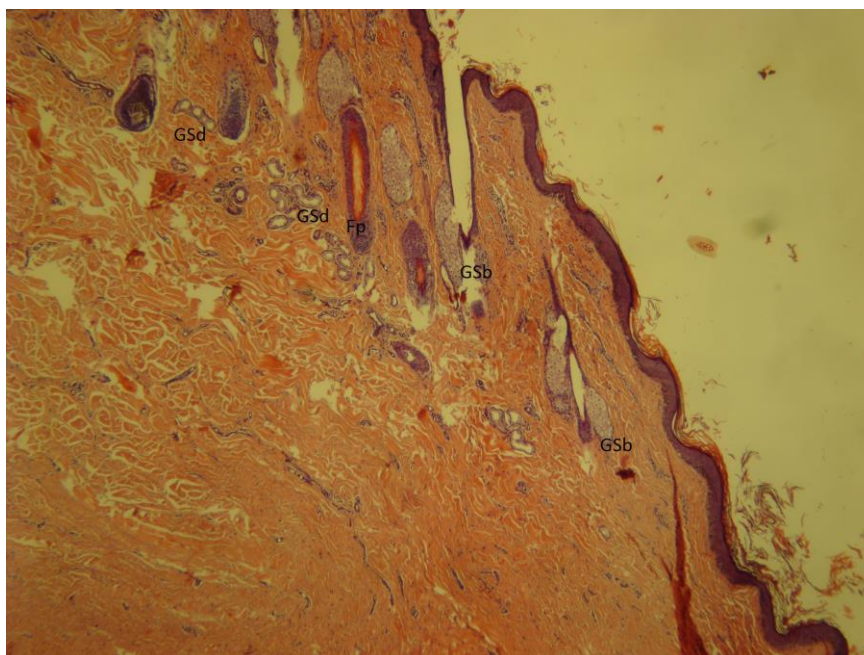
FOTOGRAFIA 14 - ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR DEZ SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE O COLAGENO FROUXO (**ClFx**); NEOVASCULARIZAÇÃO (**Nvc**) E AS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (**PMN**). MASSON-400x.

FONTE: O autor (2012).

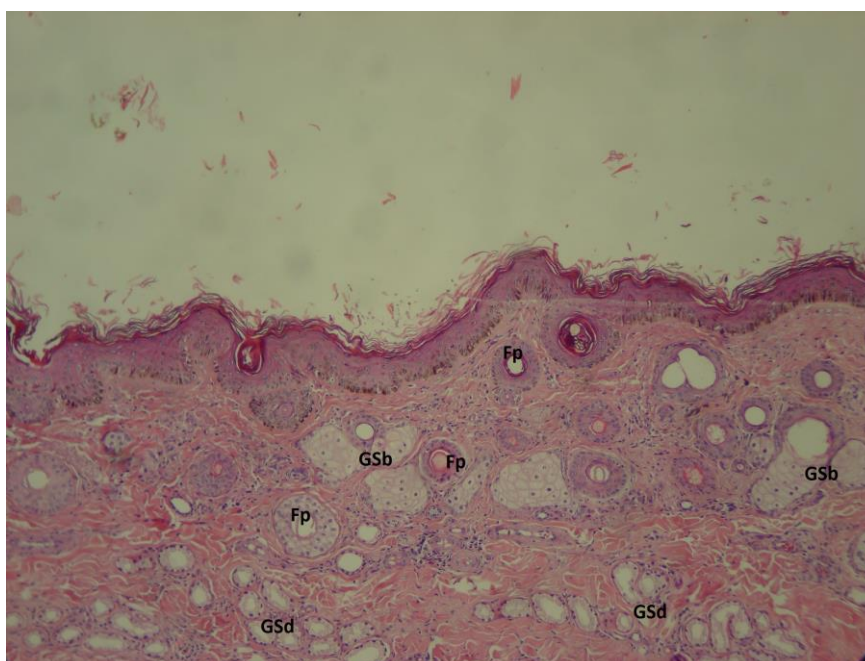


FOTOGRAFIA 15 - ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUÂNEAS TRATADAS POR QUINZE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE AS FIBRAS COLÁGENAS FROUXAS (**ClFx**); NEOVASCULARIZAÇÃO (**Nvc**). HE 400x.

FONTE: O autor (2012).



FOTOGRAFIA 16 – ASPECTO MICROSCOPIO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS POR VINTE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* DE EQUINO. DESTACA-SE O EPITÉLIO RECONSTITUÍDO E SEUS ANEXOS. GLÂNDULAS SEBÁCEAS (**Gsb**); SUDORÍPARAS (**GSd**) E FOLÍCULOS PILOSOS (**Fp**). HE - 400x.
FONTE: O autor (2012).



FOTOGRAFIA 17 - ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BIOPSIAS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS POR VINTE SEMANAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* EM EQUINOS. DESTACA-SE O EPITÉLIO RECONSTITUÍDO E SEUS ANEXOS – GLÂNDULAS SEBÁCEAS (**Gsb**); GLÂNDULAS SUDORÍPARAS (**GSd**) E FOLÍCULOS PILOSOS (**Fp**). HE 400x.
FONTE: O autor (2012).

MOMENTOS	DADOS
Semana 1	Colágeno original Folículo piloso Glândulas sebáceas
Semana 5	Fase inflamatória da ferida Necrose celular Infiltrado de polimorfonucleares Neovascularização
Semana 10	Tecido de granulação Fase de transição com remodelação Colágeno frouxo Células inflamatórias Neovascularização
Semana 15	Fibras colágenas Tecido de transição com remodelação Colágeno frouxo
Semana 20	Neovascularização Polimorfonucleares Colágeno frouxo Início da remodelação

QUADRO 2 – DADOS HISTOPATOLÓGICOS DIAGNOSTICADOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DAS FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS COM EXTRATO BRUTO DE *Persea major* NAS SEMANAS 1, 5, 10, 15 E 20.

Neste trabalho, identificamos a cicatrização cutânea, por meio de análise de imagens das feridas obtidas manualmente em papel vegetal e analisadas por *software* específico, WinRHIZO (Regent Instruments Inc.[®]), que, segundo vários autores, obedece uma sequência cronológica e pode ser de grande valor na validação de estudos que envolvem fitoterápicos com finalidade terapêutica em animais.

Por essas razões, procuramos destacar em nossas discussões, algumas características da cicatrização, em feridas cutâneas de maior relevância, destinadas a validação de fitoterápicos com indicação, empírica e científica, para este fim.

5.4 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ *et al.*, 1987; ROGERO *et al.*, 2003).

6 DISCUSSÃO

Para melhor interpretação dos possíveis efeitos do uso tópico do extrato bruto de *P. major* sobre a área de contração das feridas cutâneas de equinos, foi necessário a padronização do período de avaliação tanto da ferida lombar como da ferida na região da articulação do joelho. Para tal, definiu-se que este período seria de 24 semanas, esta conduta assemelha-se as de Martins *et al.* (2003) e Souza *et al.* (2006), ressaltando que estes autores também utilizaram os equinos como modelos experimentais, além de Branco-Neto *et al.* (2006), Garros *et al.* (2006) e Agostinhos *et al.* (2009), porém com outras espécies. Todas as comparações entre as feridas foram qualitativas. A profundidade das lesões envolveram pele e tecidos subcutâneo a semelhança das lesões em ratos relatadas nos trabalhos de Rocha *et al.*, (2004) e Magalhães *et al.* (2008) e dos estudos de Souza *et al.*, (2006) com cordeiros e Martins *et al.* (2003) e Oliveira Júnior (2010) em estudos com equinos.

Grande parte da literatura utilizada, para subsidiar este estudo, aborda as características histológicas da cicatrização de feridas cutâneas e o tempo de reparação, utilizando os extratos de diferentes plantas. Este fato deve-se a inexistência de estudos envolvendo *P. major* e a necessidade de enriquecimentos da discussão e das análises dos dados obtidos.

No contexto geral, a ferida da região lateral seria suficiente para avaliação do efeito indutor de contração cicatricial com o uso tópico do extrato bruto de *P. major*, conforme citado por Marques *et al.* (2004), mas salienta-se que os equinos possuem características próprias para cicatrização de feridas em partes distais de membros, quando comparadas a demais regiões do corpo e sua frequência na clínica médica veterinária, devido suas características morfológicas e funcionais.

Enfatiza-se que os animais usados não demonstraram dor, fato comprovado pelas mensurações das frequências cardíaca e respiratória, as quais não apresentaram alterações significativas (Apêndices A), pois na presença de dor, por ação adrenérgica, seria possível detectar um aumento desses parâmetros clínicos. Importante também ressaltar que as feridas não apresentaram edema ao seu redor.

A *P. major* é utilizada pela população em geral como indutor de cicatrização de feridas; os resultados são satisfatórios e deve-se atribuir à presença de taninos,

estes reconhecidamente associados a processos de cicatrização. Dados sugeridos por Maranhão (1998), quando descreve os resultados obtidos através da realização dos ensaios preliminares e a marcha sistemática de análise fitoquímica, desta espécie vegetal.

A aplicação da fitoterapia na clínica de equinos, em especial no tratamento de feridas cutâneas, é amplamente realizada, porém, seguindo os conhecimentos empíricos, ou seja, os conhecimentos e as crenças populares, em sua maioria, portanto sem a comprovação científica.

O emprego do extrato bruto de *P. major* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em equinos permanece ainda campo aberto para estudos, porém é importante que se ampliem os estudos experimentais com outras espécies animais para observação da sua eficácia, assim como para o isolamento de componente(s) do extrato responsáveis pela influência positiva no processo de reparação de tecidos.

Ressalta-se, que os resultados apresentados neste trabalho constituem uma base de dados inéditos ainda não relatados referentes às atividades biológicas do extrato bruto da espécie *P. major*, sendo uma fonte preliminar de informações científicas importantes que estimulam investigações futuras. Visto que, os efeitos do uso de extratos de *P. major* na cicatrização de feridas em equinos ainda não foram descritos pela literatura especializada. Porém, existem relatos na literatura brasileira, como os de Martins *et al.* (2003) com *S. barbatiman* (Barbatimão), *C. officinalis* (calêndula) e *S. officinale* (confrei), de Souza *et al.* (2006) em ensaios com *T. vulgare* (trigo) e, mais recente Oliveira Júnior (2010) com sementes de *H. annuus* (girassol). Souza *et al.* (2006) descreveram um tempo de cicatrização para feridas lombares de aproximadamente 35 dias e para feridas metacarpianas de 34 dias. E Martins *et al.* (2003) citaram aproximadamente 21 dias para *S. barbatiman* e *S. officinale* e 26 dias para *C. officinalis* induzirem a contração das feridas lombares para uma área final de 0,5 mm². Tais valores foram próximos, aos observados na presente pesquisa (10 semanas para as feridas lombares e 15 semanas para as feridas de membros com área final de 0,5cm²), o que corrobora com a afirmação de que o extrato bruto de *P. major* beneficiou o processo de cicatrização, da mesma forma que os demais fitoterápicos citados. Para melhor entender esta afirmativa deve-se considerar que a ferida tinha área de 500,5 cm², não foram utilizadas quaisquer associação medicamentosa. Outra vantagem do uso destes

medicamentos é o baixo custo e fácil acesso, como descreve Wendt (2005). Os dados histopatológicos encontrados na presente pesquisa foram semelhantes aos descritos por Souza *et al.* (2006), principalmente relacionados à fase inflamatória, com aumento do número de células polimorfonucleares e angiogênese, e à fase final, com maior alinhamento das fibras colágenas nas feridas tratadas, caracterizando a propriedade indutora de cicatrização de feridas do extrato utilizado, posto que estes elementos presentes no processo inflamatório são responsáveis pelo reparo tissular.

Os dados histológicos do presente estudo destacam que as principais diferenças relacionadas ao tratamento das feridas foram observadas a partir dos cortes histológicos obtidos na 10ª semana de avaliação. Reforçando que foi usada uma apresentação líquida e isto pode ter prejudicado sua ação nas feridas, o que poderia justificar o maior retardo no tempo de cicatrização. Segundo Stashak (1991), outro fator que possivelmente poderia retardar este tempo de cicatrização é o fato de que o processo inflamatório nos membros ser diferenciado em equinos, com a taxa de contração da ferida variando conforme o local da lesão. Lesões de pele de 400 cm² no flanco contraem em média 0,8 a 1 mm/dia, enquanto feridas similares nas partes distais dos membros contraem em média 0,2 mm/dia. Wilmink e Van Weeren (2004) relataram que a contração da ferida é feita através da ação dos fibroblastos diferenciados (miofibroblastos) no tecido de granulação, ocorrendo de maneira mais pronunciada nas feridas do corpo do que dos membros.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos e as considerações que deles puderam ser estabelecidas permitem concluir que:

As análises de citotoxicidade aguda *in vitro* do extrato bruto de *P. major* não demonstraram alterações citotóxicas.

As aplicações do extrato bruto sobre as feridas de equinos foram eficazes na promoção da cicatrização, permitindo a reparação das lesões.

Os dados obtidos das análises de citotoxicidade e da avaliação experimental da contração cicatricial sugerem a possibilidade de elaboração de uma forma farmacêutica contendo *P. major* com atividade cicatrizante para uso em equinos.

REFERENCIAS

AGOSTINHO, L. C.; MACHADO, M. R. F.; MARTINS, L. L.; GONÇALVES DOS REIS, A. C. Análise morfológica do processo cicatricial cutâneo de rato wistar tratado isolado e com composto associativo neem e guaçatonga. **Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, de 03 a 07 de novembro de 2009, São José do Rio Preto – SP. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_33783710804.pdf>. Acesso em: 18/11/2010.

ALECU, A.; ALECU, M.; MARCUS, G.; BREZEANU, R.; COJOCARU, A. Efeito dos medicamentos homeopáticos *Arnica montana* e *Staphisagria* no tempo de cicatrização de incisões cirúrgicas. **Cultura Homeopática**, n. 20, p. 19-21, 2007.

ANDRADE, M. S. B. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células vero**. 78f. Dissertação (Mestrado). Porto, 2007.

ANNAPURNA, J.; BHALERAO, U. T.; LYENGAR, D. S. Antimicrobial activity of *Saraca asoca* leaves. **Fitoterapia**, Milão, v.70, n.1, p.80-82, Fevereiro, 1999.

BIESKI, I. G. C., JUNIOR, E. G. O marketing na Saúde Pública – Visão atual e perspectivas futuras para melhoria na qualidade de vida, através do trabalho, saúde e educação. XVIII Simpósio de Plantas Medicina do Brasil, Manaus, AM. pg. 465-466, 2004.

BATALHA, M. O.; MING, L. C.; NANTES, J. F. D.; ALCÂNTARA, R. C. L.; CASTRO, D. M.; MACHADO, J.G.; LOURENZANI, A. E. B. BARRETO, C. V. Complexo agroindustrial de plantas medicinais e aromáticas no Estado de São Paulo: Diagnóstico e proposição de ações de melhoria da eficiência e da competitividade. Sumário Executivo do projeto. São Carlos: UFSCAR/UNESP/SEBRAE, 2002. 57 p.

BERTONE, A. L. Management of exuberant granulation tissue. **Veterinary Clinics North America**, v. 5, n. 3, p. 551-562, 1989.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24: n. 2-3, p. 119-124. 1985.

BRANCO-NETO, M.L.C., RIBAS-FILHO, J.M., MALAFAIA, O., OLIVEIRA-FILHO, M.A., CZECHKO, N.G., AOKI, S., CUNHA, R., FONSECA, V.R., TEIXEIRA, H.M., AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus*

terebinthifolius Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** [periódico na Internet] 2006; v. 21, Suppl 2, p.17-22. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 18/11/2010.

CANDIDO, L. C. **Novas abordagens no tratamento de feridas**. São Paulo. Editora SENAC. São Paulo, 2001. 282p.

CAPO, C. J. I.; CASTRO MÉNDEZ, I.; BUENO PAVÓN, V.; CARRILLO DOMÍNGUEZ, C.; ORTIZ INFANTE, M. Efecto cicatrizante de la crema de extracto etanólico de cera de caña. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 9, n. 2, 2004. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S10fibronectin28-47962004000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acessado em: 18/11/2012.

CATI, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. LUPA: Projeto de Levantamento das Unidades de Produção Agrícola no Estado de São Paulo. Campinas: CATI, 2001.

CHRISTOPHER, E. Kinetic aspects of epidermal healing. *In*: Maibach H, Rovee D. eds. **Epidermal wound healing**. St Louis: Mosby., 1972.

CLARK, R.A.R. Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. **Archives of Dermatology**, v. 124, p. 201, 1998.

COCA, K. P.; ABRÃO, A.C.F.V. Avaliação do efeito da lanolina na cicatrização dos traumas mamilares. **Acya Paulista de Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 11-16, 2007.

COELHO, C.O.C. *et al.* Biopolímero produzido a partir da cana-de-áçúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 1113, 2001.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS. T. **Patologia estrutural e funcional**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

CONTRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; LOPES, R. A.; CONTRERA, M. G. D. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v.11, p.157-60. 1985.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926-1978. v.1. 747p.

COSMO, S. A.; MAYER, B.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effect of hydro alcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 533-537. 2007.

CRUZ, A. S.; CUPPOLONI, K. M.; MARTINEZ, C. H. O.; GOMES, L. F. S. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.

CUNHA, A. P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3ª ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DART, A.J.; DOWLING, B.A.; SMITH, L.C. Topical treatments in equine wound management. **Veterinary Clinic Equine**. v.21, p.77-89, 2005.

DELAVERY, B. M.; W. M. VAN DER VEER, M. VAN EGMOND; F. B. NIESSEN; R. H. J. BEELEN, "Macrophages in skin injury and repair," **Immunobiology**, v. 216, n. 7, pp. 753–762, 2011.

DI STASI, L. C. (Org) **Plantas Medicinais: Arte e Ciência, um guia para uma pesquisa interdisciplinar**. Fundação Editora Unesp, São Paulo, SP, 1996.

DIEGELMANN, R. F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 68, p. 107, 1981.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.71, n.1-2, p.307-313, July, 2000.

DOILLON, C. J.; DUNN, M. G.; BENDER, E. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. **Collagen and Related Research**, v. 5, p. 481, 1985.

DUTRA, C., Avaliação do potencial de actinomicetos no trabalho de efluentes de Indústrias que processam madeira - Dissertação de Mestrado - UFRJ, Rio de Janeiro -1997.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTE, M. C. S.; TRONCOSO NETO, N. S.; CAMPOS, V. A.; LEMOS, R. C.; SILVESTREIN Junior, P.L. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v. 2/3, n. 1, p. 30-40. 1995/1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. v. I. São Paulo: Editora Atheneu São Paulo Ltda, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. v 2. Brasília: Editora Fio Cruz, 2010.

FERESIN, G. E., TAPIA, A., LÓPEZ, S. N., ZACCHINO, S. A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.78, n.1, p.103- 107, 2001.

FITCH, R.; SWAIM, S. F. The role of epithelialization in wound healing. **The Compendium**, Lousiania, v. 17, n. 2, p. 167-177, 1995.

FORO, A. C. M. Plantas medicinais: um auxílio para a cicatrização. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 1, n. 3, p. 7379, 1988.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TAMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J. M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SAINS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, E. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. [Periódico na internet] 2006; 21 Supl. 3: p.55-65. Disponível em:<<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 18/11/2010.

GOTTLIEB, O. R. Review article chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v.11, p. 1537-1570, 1972.

GOTTRUP, F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum. A biomechanical study. **American Journal Surgery**. 1980; 140(2):296-301.

HOERNER, W. S. Recursos biológicos amazônicos: Pesquisa e patentes sobre plantas medicinais da Amazônia. **Brazilian Journal of Latin American Studies**, v. 7, n.1, p. 41-61. 2009.

HOWEL, J. P.; MAQUART, F. X. La cicatrisation. **La Reserch**, v. 22, n. 236, p. 1174-81, 1991. (IBAMA. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm>. Acesso: 08/08/2008.

JANNING, D.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; BARAUNA, S. C. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*Rattus norvegicus*). **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 53-64, 2011.

KENT LLOYD, K. D. Wound healing. In: AUER, J. A. **Equine surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders. Cap. 3, p. 38-45, 1992.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, Milão, v.72, n.7, p.825-828, 2001.

KOEHLER, A.; GALVÃO, F.; LONGHI, S. J. Floresta ambrófila densa altomontanha: aspectos florísticos e estruturais de diferentes trechos na serra do mar, PR. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.12, n. 2, p. 27-39. 2002.

LAWRENCE, C.M.; COMAISH, H.S.; DAHL, M.G.C. Excision of skin tumors without wound closure. **British Journal of Dermatology**, v.115, p. 563, 1986.

LÓPEZ, F. Papiro Ebers. El más importante papiro médico. Disponível em: <<http://www.egiptologia.org/fuentes/papiros/ebers/>>. Acesso em 27 dezembro de 2011.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. Manual de patologia clínica veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, 3 Ed., 2007.

MAGALHÃES, M. S. F.; FECHINE, F. V.; MACEDO, R. N.; MONTEIRO, D. L. S.; OLIVEIRA, C. C.; BRITO, G. A. C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 262-269, 2008.

MANDELBAUM, S. H.; Di-SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros Dermatologia**. jul/ago 2003; 78(4):393-408. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid=SO365-05962003000400002&lng=pt&nrm=isso>. Acesso em: 05/ 01/2010.

MARANHO, L. T. **Contribuição ao estudo botânico, fitoquímico, farmacológico e microbiológico de *Persea major* Kopp (Lauraceae)**. 85f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

MARANHO, L. T.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Estudo anatômico das folhas de *Persea major* Kopp., Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmácia**. RJ. Vol. 82, n.1/2; pg. 57-61, 2001.

MARANHO, L. T.; PREUSSLER, K. H.; ROCHA, L. D. Organização estrutural da casca de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp (Lauraceae). **Acta botânica Brasileira**, Curitiba, v.23, n. 2, p. 509-515, 2009. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062009000200022>. Acesso em: 05/09/2012.

MARQUES, S. R.; PEIXOTO, C. A.; MESSIAS, J. B.; ALBUQUERQUE, A. R.; SILVA JÚNIOR, V. A. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.3, p.196-205, 2004.

MARTINEZ, F. L., Taninos vegetais e suas aplicações. Universidade de Havana Cuba. Universidade do Rio de Janeiro. Outubro de 1996.

MARTINS, P. S.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; SEQUEIRA, J. L.; NICOLETTI, J. L. M.; THOMASSIAN, A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em equinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MORI, R.; KONDO, T.; NISHIIE, T.; OHSHIMA, T.; ASANO, M. Impairment of skin wound healing in "-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. **American Journal Pathology**, v. 164, n. 4, p. 1303-1314, 2004.

MOSHER, D. F.; FURCHT, L. T. FIBRONECTIN: review of its structure and possible functions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, n. 2, p. 175-180, 1981

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 07 junho de 2010. Caderno Ciência. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/ciencia/fe0706201002.htm>>. Acesso em: 18/11/2012.

NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A.; LIMA, R. M. O. C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, Milão, v.61, n.3, p.353-355, 1990.

NETO, J. C. L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos. Disponível em: <http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>. Acesso em: 07/01/2012.

NITZ, A. C.; ELY, J. B.; d'ACAMPORA, A. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p.74-79, 2006.

NUNAN, E. A.; CAMPOS, L. M. M.; PAIVA, R. L. R.; OLIVEIRA, S. T.; DAUDOUN, H. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. E Zucc. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, Belo Horizonte, v.6, n.1, p.33-40, 1985.

OLIVEIRA, H.P. Traumatismos nos animais domésticos. Cadernos técnicos da escola de veterinária da UFMG, n.7, p.1-57, 1992.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. A. T. **Efeitos do uso tópico de óleo de semente de girassol (*Helianthus annuus*) em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em equinos**. 64f. Tese (Doutorado). Centro Universitário Vila Velha, Espírito Santo, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Salud para todos em El año 2000: estratégias. Washington: Oficina Sanitária Panamericana, 1980. 75p. (Documento Oficial).

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. **Current concepts and approaches to wound healing. Critical Care Medicine**, Baltimore, v.16, n.9, p.899-908, 1988.

ORLANDO, F. B.; SILVA, A. F. G.; PARREIRA, M. W. F. Screening fitoquímico de espécimes de Lauraceae que ocorrem na região sul do estado de mato grosso do sul. Anais da 58ª. Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC - Julho/2006.

PEREIRA, A. M.; ARIAS, M. V. B. Manejo de feridas em cães e gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, v.7, n.38, p.33-42, 2002.

POSSA, D. V.; REIS, I. D.; GRECELLE, C. Z.; SCHONS, S. V. Contribuição ao estudo morfométrico de cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção com óleo de copaíba, em ratos. In: V Salão de Iniciação Científica, 2007, Ji-Paraná. Ciência & Conciência. Ji-Paraná. v.2, 2007.

PRATA, M.; HADDAD, C. GONDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, p. 43-48, 1988.

PROBST, C. W. Cicatrização das Feridas e Regeneração de Tecidos Específicos. *In*: Slater D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Manole; 1998. v.1.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB008517>>. Acesso em: 10/11/2012.

RAMESH, N.; VISWANATHAN, M. B.; SARASWATHY, A. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.79, n.1, p.129-132, 2002.

RIBEIRO, G.; MARTINS, C. B.; SILVA, V. P.; LACERDA NETO, J. C. Uso tópico de ketanserina na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 114-148, 2009.

RICHARDSON, D. C.; SWAIN, S. F.; WILHALF, D. Tratamento da ferida contaminada. *In*: Betts, C.W.; Crane, S. W. Manual de terapêutica cirúrgica dos pequenos animais. São Paulo: Manole; 1988. p.173-200.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: Epu, Edusp, 207p. 1976.

ROCHA, A. A. Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC). Universidade de Franca, 2006.

ROCHA, R. P.; ROCHA, E. L. P.; HAMES, R. L.; SPOSETO, T. B. Estudo comparativo do processo de cicatrização com o uso do óleo de semente de girassol e triglicérides de cadeia média: modelo experimental em ratos. **Social Science Medicine**, v. 14, n. 3, p. 203-208, 2004.

ROGERO, S. O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Material Research**, v. 46, n. 3, p. 317-320, São Paulo, 2003.

ROSE, F.R.; HODGSON, R.D. **Manual of equine practice**. 2ª ed. W.B. Saunders company. Philadelphia. 818p. 2000.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D. C.; SIMÕES, M. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamentos com solução de com solução de papaína a 2%. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, n. 1 p.18-23. 1993.

SANDSTROM, B. Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. **Cell Research**, v.37, pp. 552-568, 1965.

SANTOS, M. F. S.; CZECZKO, N. G.; NASSIF; P. A. N.; RIBAS-FILHO, J. M.; ALENCAR, B. L. F.; MALAFAIA, O. Avaliação do Uso do Extrato Bruto de *Jatropha Gossypifolia* L. na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21 (Suplemento 3), 2006.

SIEBEN, P. G. **Composição fitoquímica de cascas de *Persea major* (Meisn.) L. E. Kopp (Lauraceae) e desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso tópico**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 87p., 2012.

SIEVER, T. R.; MARANHO, L. T.; VASCONCELOS, E. C.; OLIVEIRA, C. M. R. Estudo preliminar dos alcalóides presentes no extrato bruto da casca de *Persea major* Kopp, Lauraceae. In: 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007, Água de Lindóia – São Paulo. Anais... São Paulo. 2007. Disponível em: <<https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1340-2.pdf>>. Acesso em 28/08/2008.

SILVA, T. S. S. **Estudo da tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 85p., 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P de V. M.; AULER, L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed da UFSC, 2010.

SIMÕES, M. J.; CABRAL, A. C. V.; BOYACIYAN, K.; KULAY JR, I.; SASSO, W. S. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**. v.104, n. 3, p.132-151, 1986.

SKINNER, F. A. Antibiotics. In: PAECH, K., TRACEY, K. V. **Moderne Methods of Plant Analysis**. Berlin: Göttingen Heidelberg, 1955. v.3, p. 626-725.

SOLÓRZANO, O. T.; REYNA, H. H.; VELÁZQUEZ J. L. L.; AGUILAR, J. P.; VALENCIA M. G. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crônica erosiva. **Revista de la Facultad Medicina** - UNAM, v. 44, n. 1, p. 79 - 83, 2001.

SOUZA, D. W.; MACHADO, T. S. L.; ZOPPA, A. L. V.; CRUZ, R. S. F., GÁRAGUE, A. P.; SILVA, L. C. L. C. Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 9 - 13, 2006.

STASHAK, T. S. **Equine wound management**. Philadelphia: Lea & Febiger. 278p. 1991.

STASHAK, T.S.; FARSVEDT, E.; OTHIC, A. Update on wound dressings: indications and best use. **Clinical techniques in equine practice**. v.3, p.148-163, 2004.

STEGMAN, S. J.; TROMOVITCH, T. A.; GLOGAU, R. G. GRAFTS. In: Basics of Dermatological Surgery. St Louis: Mosby, 1982.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – SISTEMA DE BIBLIOTECAS. Normas para apresentação de documentos científicos. 2ª. Ed. Curitiba. Editora UFPR, 2007.

VAN WINKLE, W. The fibroblast in wound healing. **Journal of Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 124, p. 369, 1967.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N. R.; BORGES, J. H. S.; VINCENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

VITORINO FILHO, R. N. L.; BATISTA, M. C. S.; VERÇOSA, B. L. A.; SILVA, S. M. M. S.; MACHADO, A. S. F.; BONFIM, J. M.; BRANDÃO, A. A. C.; SOUSA, J. B. B. Avaliação do uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3; p. 279-286, 2007.

WENDT, S.B.T. **Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais.**

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. 85p. 2005.

WHITE, G. W. MALTODEXTRAN, N. F. POWDER: A new concept in equine wound healing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.15, p.296-298, 1995.

WILMINK, J. M.; VAN WEEREN, P. R. Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds. **Clinical Techniques in Equine Practice**., v.3, n.2, p. 123-1133, 2004.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; PEDROSA, R. C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001A.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental.** In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (eds.). Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, p.17-46. 2001B.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Hospital Veterinário
Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais

☐ BOVINO ☐ CAPRINO ☒ EQÜINO ☐ OVINO ☐ SUÍNO

DATA: 17/11/09

FICHA CLÍNICA Nº 217/09

☒ Nova Consulta

☐ Reconsulta

Nome do Animal: Pretinha Sexo: F Idade: _____
Raça: SRD Pelagem: Castanha Peso: _____
Local onde se encontra: HV-UFPR Atividade: _____

Proprietário: HV-UFPR CPF: _____
Endereço: _____ Nº: _____
Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____
Telefone: _____ Celular: _____

ANAMNESE:

Animal do HV-UFPR. Estava na Fazenda Congiara quando se feriu na cerca. Retorna ao HV para tratamento.

Vacinação: _____
Controle Parasitário: _____

EXAME FÍSICO:

Atitude: ☒ quadrupedal ☐ decúbito _____
Comportamento: ☒ alerta ☐ apático ☐ inquieto
Conjuntiva ocular: normalizada Mucosa oral: normalizada
FC: _____ FR: _____ TPC: _____ Temperatura retal: _____
Mov. Intestinal: Freq. Cecal: _____ Freq. Ruminal: _____
QSE _____ QSD _____
QIE _____ QID _____
Defecação: ☒ Presente ☐ Ausente Aspecto: normal
Micção: ☒ Presente ☐ Ausente Aspecto: normal

OBSERVAÇÕES:

Susado em MPE, na altura do joelho.

EXAMES COMPLEMENTARES:

- ☐ Hemograma ☐ Fibrinogênio ☐ Contagem Plaquetas ☐ Hematócrito ☐ PPT
☐ CPK ☐ FA ☐ GGT ☐ AST ☐ Creatinina ☐ Uréia
☐ Pesquisa de hematozoário ☐ Urinálise ☐ Endoscopia
☐ Líquido Sinovial (Articulação: _____) ☐ Líquor
☐ Coproparasitológico (Resultado: _____)
☐ Diagnóstico por Imagem: ☐ RX ☐ US
 Região: _____
☐ Necropsia ☐ Histopatológico

OUTROS: _____**DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS:** _____**DIAGNÓSTICO:** _____

PROGNÓSTICO: ☒ Bom ☐ Reservado ☐ Ruim

TRATAMENTO: *fora instituído tratamento com redução de pou de condra.*

ALTA: _____

Recomendações: _____

RESENHA: